

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究
(H23-新興-一般-010)

平成 23 年度－平成 25 年度 総合研究報告書

平成 26 年 (2014) 3 月

研究代表者 高 崎 智 彦

(国立感染症研究所)

目 次

I 総合研究報告

- 我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する
総合的対策の確立に関する研究. 研究代表者 高崎智彦 1

II 分担研究報告

1. デングウイルス、チクングニアウイルスの迅速検査法の研究 9
研究分担者：森田公一（長崎大学熱帯医学研究所教授）
2. チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作及びキメラデング 1 型ウイルス様粒子の作製
と診断用抗原としての評価 13
研究分担者：小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）
3. GENEUCUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発、および健常成人における細胞
培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果 17
研究分担者：高橋和郎（大阪府立公衆衛生研究所副所長兼感染症部長）
4. 媒介蚊からの簡便な病原体ゲノム検出、流行地における媒介蚊のナトリウムチャネル遺伝子調
査、および日本の新規媒介蚊の確定 22
研究分担者：江下優樹（大分大学医学部感染予防医学講座准教授）
5. ヒトスジシマカのデングウイルス感受性の評価およびジェノタイプング法による媒介蚊の殺
虫剤感受性評価に関する研究 29
研究分担者：澤邊京子（国立感染症研究所昆虫医科学部長）
6. コモンマーモセットを用いた節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立 . 33
研究分担者：鈴木隆二（国立病院機構相模原病院 臨床研究センター室長）
7. デングウイルス感染症の診断および予防対策に関する研究 41
研究分担者：モイ メンリン（国立感染症研究所ウイルス第一部研究官）
8. デングウイルス新規ワクチン開発のための病理学的評価系の確立 47
研究分担者：永田典代（国立感染症研究所感染病理部室長）
9. 海外渡航者を対象にした蚊媒介性ウイルス感染症の情報提供 51
研究分担者：濱田篤郎（東京医科大学病院 渡航者医療センター教授）
10. チクングニアウイルスのコモンマーモセットモデルにおける病理学的解析および夏期の
日本旅行後デング熱を発症したドイツ人デング熱患者症例と実験室確認診断 56
研究分担者：倉根一郎（国立感染症研究所副所長）

III 研究成果の刊行に関する一覧表 59

IV 研究成果の刊行物・別刷・DVD 63

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合
的対策の確立に関する研究
(H23-新興-一般-010)

平成 23 年度－平成 25 年度 総合研究報告書

平成 26 年 (2014) 3 月

研究代表者 高 崎 智 彦

(国立感染症研究所)

目 次

I 総合研究報告

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する

総合的対策の確立に関する研究. 研究代表者 高崎智彦 1

II 分担研究報告

1. デングウイルス、チクングニアウイルスの迅速検査法の研究 9
研究分担者：森田公一（長崎大学熱帯医学研究所教授）
2. チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作及びキメラデング 1 型ウイルス様粒子の作製
と診断用抗原としての評価 13
研究分担者：小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）
3. GENEUCUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発、および健常成人における細胞
培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果 17
研究分担者：高橋和郎（大阪府立公衆衛生研究所副所長兼感染症部長）
4. 媒介蚊からの簡便な病原体ゲノム検出、流行地における媒介蚊のナトリウムチャネル遺伝子調
査、および日本の新規媒介蚊の確定 22
研究分担者：江下優樹（大分大学医学部感染予防医学講座准教授）
5. ヒトスジシマカのデングウイルス感受性の評価およびジェノタイプング法による媒介蚊の殺
虫剤感受性評価に関する研究 29
研究分担者：澤邊京子（国立感染症研究所昆虫医科学部長）
6. コモンマーモセットを用いた節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立 . 33
研究分担者：鈴木隆二（国立病院機構相模原病院 臨床研究センター室長）
7. デングウイルス感染症の診断および予防対策に関する研究 41
研究分担者：モイ メンリン（国立感染症研究所ウイルス第一部研究官）
8. デングウイルス新規ワクチン開発のための病理学的評価系の確立 47
研究分担者：永田典代（国立感染症研究所感染病理部室長）
9. 海外渡航者を対象にした蚊媒介性ウイルス感染症の情報提供 51
研究分担者：濱田篤郎（東京医科大学病院 渡航者医療センター教授）
10. チクングニアウイルスのコモンマーモセットモデルにおける病理学的解析および夏期の
日本旅行後デング熱を発症したドイツ人デング熱患者症例と実験室確認診断 56
研究分担者：倉根一郎（国立感染症研究所副所長）

III 研究成果の刊行に関する一覧表 59

IV 研究成果の刊行物・別刷・DVD 63

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する
総合的対策の確立に関する研究

研究代表者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部 室長）

研究要旨：

デングウイルス(DV)はフラビウイルス科、チクングニアウイルス(CHIKV)はトガウイルス科アルファウイルスに属する RNA ウイルスである。どちらもネッタイシマカあるいはヒトスジシマカなどの蚊を媒介としてヒトに感染する。DV はデング熱(DF)やデング出血熱(DHF)という異なる病態を惹起する。世界的に年間数千万～1億人が DF、数十万人が DHF を発症している。地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり流行地域拡大が最も危惧されている感染症である。我が国の輸入症例も年々増加し、2013 年には 249 例と感染症法施行後最高の報告数であった。2010 年以後は震災後の海外旅行者が減少した 2011 年を除いて、毎年 200 例以上のデング熱輸入症例が報告されている。2013 年 8 月に日本国内を旅行したドイツ人旅行者が、直行便でドイツに帰国後デング熱を発症した日本からのデング熱輸出症例の疑い症例が報告され、患者検体をドイツから取り寄せて確認検査を実施したところ、デングウイルス 2 型感染であることを確認した。

また、デング熱と類似の症状を来す Zika 熱が 2007 年のミクロネシアでの流行以後、太平洋島嶼国、東南アジアで流行が散発している。2013 年 12 月にフランス領ポリネシア BoraBora 島から我が国への初めての Zika 熱輸入症例 2 例を病原体検査および中和抗体測定により確認した。今後 IgM 抗体検査法を確立する必要がある。また、チクングニアウイルスに近縁であるロスリバーウイルスによりオーストラリアで流行しているロスリバー熱の初輸入症例を 2013 年 5 月に確認し、IgM 抗体検査法を含めて実験室診断法がほぼ確立された。

本研究班では、現場で迅速に対応できる前処理を簡略化した検査法の確立のために LAMP 法のデングウイルス、チクングニアウイルス検出法（ヒト検体および蚊）を改良した。また日本脳炎ウイルスレプリコンを用いた 1 回感染性フラビウイルス粒子産生系を構築し、抗原性を保持しているだけでなく中和試験のような機能的検査にも利用できることが明らかになった。抗体検査においては、イムノクロマト法を開発し良好な感度、特異性が得られた。またデングウイルス粒子抗原検出イムノクロマト法も開発に着手し、ウイルス抗原を昆虫細胞発現ベクターにより増殖させた。

動物モデルに関しては、デングウイルスに対して感受性の高いマーモセットが、チクングニアウイルスに対しても同等の感受性を有することが明らかとなった。しかし、マーモセットは、旧世界ザルと比較すると免疫学的背景は明らかでない部分が多い欠点がある。そこでマーモセットの CD14、IL-1a、IL-1b、IL-12b の 4 遺伝子および T 細胞レセプター遺伝子 (TCR 遺伝子) の α 鎖、 β 鎖可変領域 (TRAV、TRBV) の 56 遺伝子を同定したデータをもとに、免疫関連遺伝子発現量を評価するために定量リアルタイム PCR (qPCR) を開発してきたが、これを実際にデングウイルス、チクングニアウイルス感染マーモセットモデルにより応用した。

2011 年 2 月から、感染症法において 4 類感染症全数把握疾患に規定されたチクングニアウイルスは、2005 年に西インド洋諸国で流行が拡大した後、インド、スリランカに拡大し、2007 年にはインドからの輸入症例によりイタリアで国内流行が発生した。2011 年にはフィリピンミンダナオ島で国内流行が確認され、2012 年にはメトロマニラをはじめ各地に拡大した。我が国への輸入症例も 2013 年は 13 例であった。ヒトスジシマカにおいては DENV1 の高い増殖性が認められたが、一方で、DENV2 は、DENV1 に比べて増殖性が低いという結果が得られたが、1942-45 年の国内デング熱流行株がデングウイルス 1 型株であったこととの関連は明確ではない。また、チクングニアウイルスに対する国内蚊感受性の検討の結果、ヒトスジシマカ以外にリバーズシマカとヤマダシマカも感受性を有することが明らかとなった。

また、旅行者ワクチンとしての細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの評価として成人での抗体応答を解析した。その結果、接種後一ヶ月で上昇した中和抗体が、一年後に有意に低下することが明らかになった。特に接種前の日本脳炎抗体陰性接種者では抗体低下が顕著であった。

海外渡航者や海外派遣企業の健康管理担当者を対象に、蚊媒介感染症のうちでもデング熱に関する意識調査や知識レベルの調査を行った。「流行地域の在留邦人」や「海外派遣企業の健康管理担当者」についてはデング熱への関心が高いが、媒介蚊の対策など予防面での知識が不足していることが明らかになった。こうした調査結果にもとづき、ホームページ、パンフレット、ポスターなどによる情報提供を開始した。

分担研究者：

小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）

森田公一（長崎大学熱帯医学研究所教授）

高橋和郎（大阪府公衆衛生研究所副所長）

永田典代（国立感染症研究所感染病理部
室長）

澤辺京子（国立感染症研究所昆虫医科学部
部長）

鈴木隆二（相模原病院臨床研究センター室
長）

江下優樹（大分大学医学部・感染分子病態
制御学講座准教授）

モイ メンリン（国立感染症研究所ウイル
ス第一部 研究官）

濱田篤郎（東京医科大学渡航者医療センタ
ー教授）

倉根一郎（国立感染症研究所副所長）

A. 研究目的

デングウイルス(DV)はフラビウイルス科、チクングニアウイルス(CHIKV)はトガウイルス科アルファウイルスに属する RNA ウイルスである。どちらもネッタイシマカあるいはヒトスジシマカなどの蚊を媒介としてヒトに感染する。DV はデング熱(DF)やデング出血熱(DHF)という異なる病態を惹起する。世界的に年間数千万～1億人が DF、数十万人が DHF を発症している。地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり流行地域拡大が最も危惧されている感染症である。我が国の輸入症例も年々増加し、2013年には 249 例と感染症法施行後最高の報告数となった。また、2013年8月に日本国内

を旅行したドイツ人が直行便で帰国後、デング熱を発病した事例があり、病院の検査室レベルで実施できる迅速キットの評価を行い普及の可否を検討する。輸入症例中に毎年十数例の出血熱、重症例の報告がある。DHF は発症すると全身血管からの血漿漏出、補体系の異常活性化、血小板減少に伴う出血傾向、粘膜からの出血、播種性血管内凝固症候群などをきたし致死的となる。

また、2005年に西インド洋諸国で流行が拡大したチクングニア熱は、インド、スリランカに拡大し、2007年にはインドからの輸入症例によりイタリアで国内流行が発生し、2011年にはフィリピンミンダナオ島で流行が確認され、2012年にはメトロマニラに流行が波及し、ルソン島以外の島々にも流行が拡大、継続している。

昆虫媒介性ウイルス感染症流行の拡大傾向のなかで、より迅速な病原体、血清診断法を開発し地方衛生研究所、検疫所等に技術移転する。また輸入症例に対しては、海外渡航者や医療従事者への啓発ガイドブックとビデオ等を作成し、海外渡航、駐在先での感染防止策を確立する。また、CHIKV、DV に対する新たなワクチン開発のための基礎データを収集する。媒介蚊対策は、CHIKV、DV は国内に生息するヒトスジシマカが媒介可能であるため、国内のヒトスジシマカサーベイランスと両ウイルス感受性について解明する。多くの日本人は DV と近縁な日本脳炎ウイルスに対する抗体を保有している。抗日本脳炎抗体が DV 感染者における感染増強現象を、我々の開発した Fc レセプター発現 BHK 細胞を用いて感染増強抗体を測定し、わが国に DV が侵入した場合の重症デング熱発生頻度を推定する。

B. 研究方法

1. 診断法の開発・評価

RT-LAMP 法を用いたウイルス遺伝子迅速診断法の開発・応用

RT-LAMP 法による媒介蚊からのウイルス検出法、ヒトの全血からの前処理を省略したウイルス遺伝子検出法を検討した。チクングニアウイルスと媒介蚊乳剤あるいはヒトの血液を混合し、前処理を省略して RT-LAMP 法によりチクングニアウイルス増幅を試みた。

GENECUBE を用いたアルボウイルスウイルス遺伝子迅速診断法の開発

検体の遺伝子抽出から核酸増幅・検出・判定までを行う全自動遺伝子解析装置である GENECUBE® (TOYOBO) による GENECUBE Qprobe 法のためのプライマーと Q プローブ設計し、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの検出感度、特異性を検討した。

1 回感染性フラビウイルス粒子の産生

JEV Nakayama 株のレプリコン cDNA を CMV プロモーターと HDV リボザイム配列の間に挿入したレプリコンプラスミドを作製した。また、このレプリコンから NS5 領域でフレームシフトさせ、RNA ポリメラーゼ活性を持たない変異体も作製した。JEV の構造蛋白質発現プラスミドは、JEV Nakayama 株由来の C-E、C、prME 領域それぞれの cDNA を CAG プロモーター下流に挿入して構築した。

2. ワクチン

成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答

健康成人 272 名 (20~72 歳、平均 43 歳) に細胞培養日本脳炎ワクチン (ジェービック V®) を接種し、約一ヶ月後の抗日本脳炎中和抗体価を測定し、さらに接種一年後の中和抗体価を測定し、中和抗体 (防御抗体) の維持に関して検討した。

3. 動物モデルの開発、病態解析

マーモセットの免疫学的解析法

デングウイルス感染霊長類モデルとして確立されつつあるマーモセットは、新世界ザルであり免疫学的背景は明らかでない部

分は多い。そこで、サイトカイン系の発現解析、MHC、T 細胞レセプター、個体識別マーカーなどを検討し、ハウスキーピング遺伝子 (HKG) および免疫関連遺伝子の特異的プライマーをヒト配列と相同性の高い部分を採用し設計し、定量リアルタイム PCR を構築した。日本脳炎ウイルスを腹腔接種し、ウエストナイル脳炎を発病した感染マウス脳内の細胞性免疫 (ウイルス特異的脳内浸潤 T 細胞) を解析した。

デングウイルス初感染マーモセットにおける生化学および免疫学の解析

マーモセットに DHF0663 株、D2/Hu/Jamaica/77/2007NIID 株、D2/Hu/Maldives を 1.8×10^5 pfu/dose から 1.8×10^3 pfu/dose まで 10 倍段階希釈したウイルスをそれぞれ各 2 頭ずつ背側皮下に接種し、接種前および接種後 2、4、7、14、21 日目に採血を行なった。対象グループ (4 個体) は、採血のみ行なった。さらに、4 個体においては、DENV-2 (DHF0663 株) の接種を行い、接種後 2、4、7、14 日目に採血を実施した、血液一般検査、生化学検査、ウイルス遺伝子検査、抗体検査を実施した。日本脳炎ウイルス感染マウス脳炎発症にか

かわる脳内浸潤 T 細胞の解析

JEV は S982 株を使用し、7 週雌 C57B/6j マウスに感染させ、13dpi に脳と脾臓から total RNA を抽出し、TCR レパトア解析、相補性決定領域 3 (CDR3) size spectratyping、CDR3 アミノ酸配列解析を実施した。WNV および TBEV で同様の解析により得られた結果を基に、ウイルス間における脳内浸潤 T 細胞の特異性を比較した。リアルタイム定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて細胞性免疫にかかわる各種マーカーの発現量を定量しサイトカインバランスを解析した。

病理学的解析

チクングニアウイルス感染マーモセットの諸臓器を病理学的に解析した。また、新生仔マウスにデングウイルスを脳内接種し、マウス組織を用いて参照標本作製し、ホルマリン固定およびパラフィン包埋標本におけるウイルス特異的モノクローナル抗体

の交差反応性と至適条件の検討を行い、組織切片上のウイルス抗原検出系を検討した。

(倫理面への配慮)

上記動物実験は、国立感染症研究所および各関連施設における実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

4. 媒介蚊の殺虫剤感受性試験

2009年および2010年にフィリピンで採集したネッタイシマカ幼虫サンプル(エタノールに浸漬)より1頭ずつDNAを抽出し(REDEExtract-N- Amp Tissue PCR Kit, Sigma-Aldrich), PCRの鋳型とした。4カ所のアミノ産置換をターゲットとするために、2組のPCRを行った。すなわち、I1011MorV, L1014F, V1016G, F1534Cである。I1011MorV, L1014F, V1016G, F1534Cの遺伝子断片を増幅した。また、I1011MorVおよびL1014Fを検出するためにaegSCF3プライマーでシーケンス解析を行い、V1016Gを検出するためにaegSCR22プライマーを用いた。また、F1534Cを検出するためにaegSCR8プライマーを用いてシーケンス解析を行った。

タイのネッタイシマカ幼虫を野外で採集し、繁殖させて成虫になるまで育てた。成虫にし0.75%ペルメトリンに1時間暴露させて生存したネッタイシマカ成虫をペルメトリン耐性とし、ペルメトリン耐性シマカのナトリウムチャンネルドメインIIS6の部分断片を、RT-PCR法で増幅させ、配列決定を行った。それらの個体から全RNAを抽出後、kdr遺伝子ドメインIIのS4ならびにS6をカバーする領域のfirst strand cDNAをPCR増幅させた。PCR生成物を精製し、遺伝子配列を決定し、変異を同定した。

5. 診断技術等の技術移転

地方衛生研究所、検疫所にウイルス遺伝子検査のための陽性コントロールを配布できるようにウイルスRNA遺伝子の常温保存・輸送方法を検討した。RNA抽出キットを用いて抽出したデングウイルス1-4型RNA遺伝子を、RNA stable tube (RNA stable 1.5ml Screw-Cap Tube)に入れ、蓋を緩めた状態で真空遠心機により乾燥させる。乾燥させたチューブを室温(15-25°C)、30°Cおよび40°Cで長期保存して、-80°C凍

結保存のものとりアルタイム逆転写PCR (TaqMan)法により評価した。

6. 海外旅行者への啓蒙ツール開発

「海外旅行に興味のある者」や「海外派遣企業の担当者」を対象に、蚊媒介性感染症のうちでもデング熱に関する意識調査や知識レベルの調査を行った。「海外旅行に興味のある者」についてはデング熱への関心が低く、また病気の基本的な情報に乏しい状況にあることが明らかになった。また、「海外派遣企業の担当者」については、デング熱への関心が高いものの、その予防方法(とくに蚊の対策)についての知識が不十分であることが明らかになった。また、海外渡航者への効果的な情報提供を行うためホームページを充実させ(<http://www.tra-dis.org>)、東南アジア各国におけるデング熱流行状況もホームページに掲載した。
(<http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/dengue.htm>)

C. 研究結果

1. 診断法の開発・評価

1 回感染性フラビウイルス粒子の産生

JEVのレプリコンcDNAをCMVプロモーター下流に挿入する事により、in vitroでRNA合成をする事なく、プラスミドを直接細胞に導入してJEVゲノムを複製させる事が出来た。またこの時に構造領域発現プラスミドを同時にトランスフェクションすれば、1回感染性のウイルス粒子が得られる事が明らかとなった。これを用いて中和試験を実施したところ、生ウイルスを用いた結果と同等であった。

ウイルス遺伝子迅速診断法の開発

(1) (RT-LAMP)法

RTランプ法では全血を10倍に薄めることで、RNA抽出のような前処理を実施することなくチクングニアウイルス遺伝子を検出できた。

(2)GENECUBEを用いたアルボウイルス遺伝子迅速診断法の開発

DVは1-4型すべて検出可能であった。検出感度は4型が10コピー、3型が100コピーであった。最少検出ウイルス力価は1

型 2.3x10²PFU, 2 型 6.0x10⁴PFU, 3 型 3.2x10³FFU, 4 型 2.3x10²FFU であった。J E V Beijing-1 株に対する検出限界は、1.0x10²FFU であった。

迅速抗体検査キットの開発

IgM捕捉法によりデングウイルス特異的イムノクロマト法を作製し、ベッドサイド利用できる迅速抗体検査を開発した。この検査に用いることのできる安全なウイルス粒子様抗原を昆虫細胞で安定に発現する系を構築した。

2. ワクチン

旅行者ワクチンとしての細胞培養日本脳炎不活化ワクチンの評価

ワクチン接種者のうち継続調査ができた154名の幾何平均抗体価は、ワクチン接種1ヶ月後87.6倍から1年後には21.8倍と約1/4に低下した。1年後の陰転率は21.4%で、ワクチン接種後の抗体価が低いほど陰転化する割合は上昇した。ワクチン接種前の中和抗体価が<10で抗体陽転した80名の群では、1年後<10に陰転化した例は30例(37.5%)であり、1年後に陰転化した31例の96.7%を占めた。一方、ワクチン接種前の中和抗体価が≥10ワクチン接種前の中和抗体価が≥10で抗体上昇した64名の群では、1年後<10に陰転化した例は1例(1.6%)であった。

3. 動物(霊長類)モデルの開発、病態解析

マーモセットの免疫学的解析法の確立

(1) 8種類のハウスキーピング遺伝子(HKG)の各組織における発現量が最も多かったのはrRNAで、逆に少なかったのはUBCであった。

(2) *geNorm* を用いた遺伝子発現安定性を厳密に調べるため *geNorm* を用いて解析を行った結果、脾臓、空腸、小脳は他の組織と比べて安定性が低かった。しかし、すべての組織で8遺伝子解析時において、安定性が高いことを示した。全組織で2遺伝子のみでnormalizationが十分であることを示した。多くの組織において、GAPDH、ACTB、SDHA、TBPはランキングが高く、逆にHPRT、rRNA、B2Mは低かった。

(3) マーモセットとヒト白血球における

各免疫関連遺伝子の発現を比較したところCD4、IL-4の発現量は、ヒトよりもマーモセットで有意に低値を示したが、IL-10、IL-12β、IFN-γは有意に高値を示した。CD8/CD4比において、マーモセットではヒトよりも有意に高値を示した。さらにIFN-γ/IL-4、IL-2/IL-4比においてもマーモセットはヒトよりも有意に高値を示し、Thバランスがヒトと異なることを示した。

デングウイルス初感染マーモセットにおける生化学および免疫学の解析

生化学検査ではDENV-2接種マーモセット(5個体)においてAST値、ALT値の上昇が認められた。LDH値上昇は、6個体に認められた。BUN上昇は2個体に認められた。MockグループにおけるAST、ALT、LDHおよびBUNの有意な上昇は認められなかった。血液一般検査では、血小板の減少が、ウイルス接種12個体中5個体に認められた。さらに、9個体においては白血球数の減少が認められた。DENV-2接種7日目のマーモセットにおいて、Mockと比較して、白血球数が有意に減少した(P=0.03)。

日本脳炎ウイルス感染マウス脳炎発症にかかわる脳内浸潤T細胞の解析

TCRレパトア解析では、JEV感染マウスの脳では、TCRAV8-1、10-1、BV2-1が有意に増加していたが、その増加の程度はSurviving群とDying群で差は有意でなかった。TRA8-1に対してCDR3 size spectratyping解析を行った結果、高いクローナリティーが認められた。CDR3アミノ酸配列解析で、重症群では複数の同一クローンを個体間で認められ、そのクローンの一部は軽症群にも確認された。しかし軽症群では群に共通するクローンは認められなかった。J遺伝子の発現パターンの解析の結果、Surviving群とDying群では異なるJ遺伝子の使用率がそれぞれ高くなっていることが確認された。リアルタイムPCR解析で、Mock群の脳と比較して感染マウスの脳ではCD3、CD8、CD25(IL-2R)、CD69、Perforin、Granzyme A、Granzyme Bの発現レベルが増加した。Surviving群と比較するとDying群ではPerforin、Granzyme A、Granzyme Bが有意

に上昇していた。また脳内サイトカインバランスを測定した結果、脳内サイトカインバランスは感染後徐々に Th1 側に偏っていた。しかし体重により予後判定のできる 13 dpi では Dying 群では Surviving 群と比較してより Th1 側に偏っていた。

フラビウイルス脳炎の病態解析

脳炎を起こすフラビウイルス感染により異なる病態を示す群間で、ウイルス感染免疫に重要な役割を示す T 細胞のクローンレベルでの変化がこれらの表現型に關与している可能性がある。今後は今回検討したものの以外の V フェミリーのクローンレベルの詳細な検討を行うとともに、サイトカインレベルに關与する制御性 T 細胞關連因子にも着目し感染後の予後決定因子を検索する必要がある。

病理学的解析

チクングニアウイルス感染マーマセットの諸臓器を病理学的に解析したところ、CHIKV 接種 4~21 日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出された。また肝臓および脾臓において特異的抗原が検出され、肝臓においては肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤、脾臓においては二次濾胞の形成および starry sky 像が観察された。また、新生仔マウスにデングウイルスを脳内接種し、マウス組織のホルマリン固定およびパラフィン包埋標本におけるウイルス特異的モノクローナル抗体の交差反応性と至適条件の検討の結果、Anti-Dengue Virus E glycoprotein antibody (ab80914)が良好な反応を示した。

4. 媒介蚊の薬剤感受性試験

(1) ペルメトリン耐性シマカのアトリエドメイン IIS6 の部分断片を、RT-PCR 法で増幅させ、配列決定を行った。4 つの塩基変異が検出された。2 つの突然変異で、2 つのアミノ酸が置換されたすなわち、S989P (T→C) と V1016G (T→G) であった。この突然変異部位については、82 サンプルの中で、SS 遺伝子型が卓越していることがわかり (n= 64)、それに SR (n= 14) ならびに RR 遺伝子型 (n= 4) が続いた。得られたデータから、これらのアミノ酸置換が、

ペルメトリン耐性シマカのアトリエドメイン IIS6 の部分断片を、RT-PCR 法で増幅させ、配列決定を行った。

(2) 2009 年にフィリピン国内 30 カ所で採集された 688 頭のシマカ幼虫に關してピレスロイド剤感受性マップと比較するとこれまで中南米地域で確認されている I1011 の変異はどの個体からも検出されなかったが、V1016G の変異は 0~61% の頻度で、F1534C は 0~76.3% の頻度で確認された。G1016, C1534 とともにフィリピン全土から採集されたシマカから広範囲に確認され、特に地理的な偏りは見いだせなかった。

(3) ペルメトリン耐性シマカのアトリエドメイン IIS6 の部分断片を、RT-PCR 法で増幅させ、配列決定を行った。4 つの塩基変異が検出された。2 つの突然変異で、2 つのアミノ酸が置換された。すなわち、S989P (T→C) と V1016G (T→G) である。上記 2 ヶ所の突然変異部位については、82 サンプル中で、SS 遺伝子型が卓越していることがわかり (n= 64)、それに SR (n= 14) ならびに RR 遺伝子型 (n= 4) が続いた。

5. 診断技術等の技術移転：蚊媒介性ウイルス RNA 安定室温保存に関する研究

デングウイルス遺伝子の長期保存安定性に関する検討した結果、デングウイルス 1 型~4 型いずれの RNA も RNA stable tube 室温保存で 5 ヶ月間安定であった。また高温保存における安定性を検討した結果、1 型~4 型 30℃、40℃下に 4 週間 RNA stable tube にて保存した結果いずれも RNA は安定であった。

6. 海外旅行者への啓蒙ツール開発

デング熱などの蚊媒介性ウイルス感染症の啓蒙のために、ホームページを作成し e-learning 形式の「デング熱に関する検定」を作成した。また、ジャカルタ、マニラの在留邦人を対象に、デング熱の知識に関するアンケート調査を実施した。その結果、日本人は蚊には夜刺されるという意識が強く、デング熱の媒介蚊が夕方や明け方に刺されることが多いという知識乏しいことが明らかとなった。東南アジア主要各国 (フィリピン、ベトナム、カンボジア、ラオス、マレーシア、シンガポール、タイ、台湾)

およびオーストラリアにおけるデング熱流行状況もホームページに掲載した。

(<http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/dengue.htm>)

D. 考 察

診断法の開発としては、ウイルス遺伝子検出法の開発、検体前処理法の改良、イムノクロマト法による迅速抗体検出法の開発を行った。ウイルス遺伝子検出法としては、現場即時検査の面からの RT-LAMP 法の確立は媒介蚊の調査、血液からの前処理をなくした検出は遠心機のないベットサイドでの検査に有用で POCT (Point of care testing) の手段となると考えられる。一方、検体の遺伝子抽出から核酸増幅・検出・判定までを行う全自動遺伝子解析装置である GENECUBE®による遺伝子検出法の確立は、国内流行が拡大した場合に地方衛生研究所等のマンパワーの不足を補えるものと考えられる。抗体検査として、独自のデングウイルス IgM 抗体イムノクロマトキットを開発した。今後チクングニアウイルス IgM 抗体イムノクロマトキットも開発する予定である。また、プラスミドトランスフェクションによる 1 回感染性 JEV 粒子産生系は、中和試験などの機能性アッセイが可能である。また prME の配列を変える事によりデングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの 1 回感染性粒子の迅速簡便な作製も可能であり、遺伝子配列が分かれば対応可能である。

ワクチン開発では、最も実用化に近いと思われていた黄熱弱毒生ワクチン株とデングウイルス 1-4 型のキメラウイルスがタイの臨床試験で芳しくない結果が報告されたため (Aruneet al. ; The Lancet.380(9853):1559-67,2012)、むしろワクチンの評価方法や動物モデルに重点を置くべきであり、それがワクチン実用化への近道である。

成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答では、現在の細胞培養日本脳炎ワクチン 1 回接種の中では、20%の抗体非上昇者が存在した。やはり海外渡航者のための旅行者ワクチン接種も 2 回接種が必要である。また、幾何平均抗体価は、ワ

クチン接種 1 ヶ月後 87.6 倍から 1 年後には 21.8 倍と約 1/4 に低下した。1 年後の陰転率は 21.4% で、154 人中 31 例が非防御レベルの中和抗体価 10 倍以下となった。

動物モデルの開発では、デングウイルスは自然なマウスではウイルス血症も起こさない。ワクチンや治療薬の実用化の点からも霊長類モデルの開発を行った。新世界ザルであるマーモセットは旧世界ザルよりも高いウイルス血症を示すことから感染モデルとして有用であるが、旧世界ザルと比べて免疫系の基本情報が不足している点であるが、サイトカイン、T 細胞関連の遺伝子を同定し、その mRNA をリアルタイム PCR 法を確立したことは、マーモセットを用いる実験において、それらの解析に非常に有用である。また、デングウイルス感染病理組織の免疫染色には Anti-Dengue Virus E glycoprotein antibody (ab80914) が有用であることを確認した。

チクングニアウイルス (CHIKV) 感染マーモセットに関する病理学的解析では、CHIKV 接種 4~21 日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出されたこと、さらに肝臓および脾臓において特異的抗原が検出され、肝臓においては肝細胞における特異的抗原の観察、肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤が観察され、脾臓では二次濾胞の形成および二次濾胞内に starry sky 像が観察されたことから CHIKV の感染が成立した可能性が示唆された。したがって今後さらなるウイルス学および病理学的詳細を解析する必要がある。

媒介蚊の殺虫剤感受性に関しては、フィリピンのネッタイシマカがピレスロイド剤に対して高頻度で耐性であることが判明した。また、タイのネッタイシマカが 0.75 % ペルメトリンに対して 80%未満の死亡率という高い耐性を有していた。生存したペルメトリン耐性ネッタイシマカ個体のナトリウムチャンネル遺伝子の IIS4-S6 ドメインに 4 つのヌクレオチド置換が検出された。これらのネッタイシマカの殺虫剤耐性が、近年のデング熱の流行拡大と関係する可能性が考えられ、デングウイルス、チクングニアウイルス媒介蚊で日本国内に生息するヒトスジシマカについても検討する必要がある。

実験室診断法の技術移転の一環として検討した RNA 遺伝子の常温保存・輸送方法の検討では、RNA stable チューブを使用することでデングウイルスは少なくとも室温保存 5 ヶ月間安定であることが確認できた。また 4 週間の 30℃、40℃下での保存でも安定であることを確認した。本方法により国内衛生研究所、検疫所等の検査機関に輸送する際に、ドライアイスを使用する必要がなく、新たな RNA ウイルス感染症の検査体制構築に極めて有用である。

E. 結論

蚊媒介性ウイルスの遺伝子検出法として、現場即時検査法として RT-LAMP 法の確立と蚊および臨床検体（血液）への応用研究を実施し、前処理の簡略化を図った。また、検査機関におけるマンパワーの不足を補うために検体の遺伝子抽出から核酸増幅・検出・判定までを行う全自動遺伝子解析装置による検出法も検討した。また、イムノクロマト法による IgM 抗体検出キットの開発を開始した。

プラスミドトランスフェクションによる 1 回感染性 JEV 粒子産生系を確立した。prME の配列を変える事によりデングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの 1 回感染性粒子の迅速簡便な作製も可能であり、それらは感染中和アッセイ等に有用である。

デングウイルス感染動物モデルとして有用であるマーマセットの免疫学的背景を明らかにし、サイトカイン、T 細胞関連の遺伝子など免疫学的マーカーの測定系を確立した。感染マーマセットの末梢血検査（生化学、血球数）にヒトと同様の変化が生じることを確認した。

2009 年に製造承認された、細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの旅行者ワクチンとしての有効性は、2 回接種が望ましいがその防御抗体の維持能が長くないという問題点が明らかになった。

ウイルス遺伝子 RNA の常温保存・輸送法を見出し、30℃、40℃の高温下での安定性を確認した。

デング熱流行地の在留邦人のデング熱に関する認識度調査を行った結果、媒介蚊に関する知識が不足していることが判明した。

日本人海外旅行者向け感染症に関するホームページ、ポスターを作成した。

F. 健康危険情報

H23 年夏にフィリピン熱帯医学研究所 (RITM) に確認したところ、チクングニア熱のミンダナオ島での流行が確認されたが、H24 年には流行がメトロマニラを含むルソン島はじめ多くの地域に拡大した。日本人のフィリピンからの輸入症例も確認された。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究総合報告書（H23-25 年度）

デングウイルス、チクングニアウイルスの迅速診断法の研究

研究分担者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授

研究要旨：

熱帯、亜熱帯を中心として蚊で媒介されるウイルス感染症、特にデングウイルスとチクングニアウイルスの感染が世界的に増加・拡大傾向にある。とりわけ、デングウイルスによる被害は深刻であり、世界保健機関は毎年世界では 2000 万～4000 万の感染者が発生しているの見積もっている。我が国においても、アジア、アフリカ、中南米を旅行し帰国後発症するデング、チクングニア感染者が増加しており輸入感染症として重要であるが、加えて、こられのウイルスを媒介する能力のあるヒトスジシマカが本邦内で繁殖しているため、ウイルスの国内流行も視野に入れた対策を講じ、準備をしておくことが必要と思われる。本分担研究では、迅速診断法の開発、改良を目的とした。

初年度は日本で開発された遺伝子増幅検出技術である LAMP 法をデングウイルス等の検出に応用した手法を開発した。これまで開発された同様の手法の多くは 4 つあるデングウイルスの血清型それぞれについての検査が必要であったが、今回開発した方法では、1 つの検査で 4 つの型ともに高感度に検出することが可能であった。さらにデングウイルスと近縁の日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス等とは反応せず、非特異反応もほとんどなかった。このことから、本手は十分に有用な診断法であると判断した。

2 年次には迅速抗体診断法としてイムノクロマト法を開発し、あわせて安価な診断用抗原の供給を目的として遺伝子工学手法を用いたデングウイルス様粒子の作成技術を開発した。得られた結果から、本研究をさらに推進することでデングウイルスの高感度で安全、安価なベッドサイト抗体診断薬が供給可能であると判断した。

3 年次の研究では、過去 2 年間に得た経験を活用して、デングウイルスとの鑑別診断が必要な日本脳炎などの他のフラビウイルスについての LAMP 法の作成やウイルス様粒子作製法の構築を実施し、加えてこれまでに開発したデングウイルス、チクングニアウイルスの迅速検出技術をデング熱流行国で活用してデングウイルス、チクングニアウイルスの検出を実施しミャンマーでは同国に初めて ECSA 型 (East Central South African genotype) が侵入したことを明らかにした。

A. 研究目的

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症のうち、特にデングウイルス感染やチクングニアウイルス感染等の簡便、迅速なウイルス遺伝子検出系、特異的抗体検出系を開発すること。またこれらのウイルスに対する抗体検出系診断薬に利用することのできる、安全、安価な診断用抗原を作成するため、ウイルス粒子様抗原を遺伝子工学手法を用いて作成し、その特性や感度について評価すること、加えて試作した手法を疾病流行地域で活用しその有用性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. デングウイルスをはじめとする LAMP 法による迅速診断法の開発

デング 1~4 型ウイルスの遺伝子ゲノム 3' 末端にあるコンセンサス配列からデングウイルスコンセンサスプライマーを合成した。栄研化学社製の RT-LAMP キットに LAMP プライマーを添加し、ウイルス培養液、ヒト血清サンプルから抽出した RNA を添加して Auto-turbidimeter で 63°C、1 時間測定した。RT-PCR 法はインビトロゲン社製の RT-PCR キットを用いて 2. の RT-PCR プライマーとサンプル RNA を添加し常法にしたがって、遺伝子増幅を行い、アガロース電気泳動によって増幅産物を検出した。黄熱ウイルスやダニ媒介性脳炎ウイルスについても同様に LAMP 法の実験を実施した。

2. イムノクロマト法を用いた抗体診断薬の開発と、診断用抗原(ウイルス様粒子)作製

セルロース膜に抗ヒト IgM を固相化した。フラビウイルス特異的マウスモノクロー抗体の金コロイドによる標識は定法により行い、イムノクロマト法のバッファーに患者血清、標識抗体、抗原(4価のウイルス感染培養液)を混合し 15 分間 IgM 補足抗体を固相化したセルロース膜スティックを浸すことで固相化した抗ヒト IgM の位置に出現するバンドの有無で陽性、陰性を判断した。

(謝辞:イムノクロマト法については大塚製薬、織田哲也博士のご指導をいただきました。)

ウイルス様粒子の作製については昆虫細胞発現ベクター pIB/V5-His (Invitrogen 社製) を用いデングウイルス 1 型~4 型までの PrM-E 遺伝子をそれぞれ挿入して発現系を構築し blasticidin により高発現細胞を選択し安定発現系を得た。同様にして、日本脳炎ウイルスや黄熱ウイルスについてもウイルス粒子様抗原の発現を実施した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験については長崎大組換え DNA 安全委員会への申請許可を得て実施した。

3. 診断薬評価のための流行地での調査

2010 年 7 月~10 月の期間にミャンマー国にある Mandalay 小児病院をデング熱疑いで受診した患者のうちインフォームドコンセントが得られている 116 例の患者サンプルを得た。ウイルス特異的血清 IgM, IgG 検査、本研究で開発した LAMP 法や RT-PCR 法によりウイルス遺伝子の検出を実施し、併せて検体の一部をヒトスジマカ培養細胞クローン C6/36 細胞に接種しウイルス分離を実施した。分離されたチクングニアウイルスについては E 1 遺伝子部分の塩基配列を決定し MAFFT, version 7.058b によりアラインメントを調整して、Bayesian MCC tree (version 3.1.2) と FigTree software (version 1.4.0.) を用いて樹状解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用は、ミャンマー国、長崎大学熱帯医学研究所倫理委員会において承認をうけ実施した。

C. 結果

1. デングウイルスをはじめとする LAMP 法による迅速診断法の開発

デングコンセンサス RT-LAMP プライマーを用いて 4 つの血清型のデングウイルスの遺伝子が検出可能であった。検出限界は DEN-1, -2,

-3, -4 型の代表型 について、それぞれ 1, 10, 10, 1 copy であった。野生株 16 株を用いた RT-PCR 法との比較では 7 株で 10~100 倍高い感度、6 株では同じ感度であった。デングウイルスと近縁の日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス等について consensus デング RT-PCR との反応性を検討したがいずれのウイルスでも遺伝子増幅はなかった。また、過去にウイルス分離が陽性であった患者サンプルから抽出した RNA から高感度にデングウイルス遺伝子が検出され、非感染者血清からの RNA では非特異的増殖は見られなかった。

バングラデシュで 2006 年~2009 年に採取されたデング熱疑いの有熱患者血清、42 例、88 例、21 例、126 例から、このデングコンセンサス LAMP 法を用いて、25 例のデング 1~3 型のウイルスが検出できた。この結果はウイルス分離、PCR 法による検査結果と概ね一致していた。

このほか、研究期間中に黄熱ウイルス、第媒介性脳炎ウイルスについても LAMP 法を応用して迅速ウイルス検出法の開発を完了し、以前に開発していた、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、チクングニアウイルスの LAMP 法と合わせて日本に侵入する可能性のある蚊媒介性ウイルスの迅速遺伝子検出のための LAMP 法が確立された。

2. イムノクロマト法を用いた抗体診断薬の開発と、診断用抗原(ウイルス様粒子)作製

抗ヒト IgM 抗体を固相化したイムノクロマト法すなわち IgM-補足法によりデング患者血清中に存在するデングウイルス特異的 IgM 抗体の検出が 15 分で判定可能であった。非特異的な反応はみられなかった。

昆虫細胞を用いた、ウイルス様粒子産生細胞が構築できた。抗原量はウイルス感染細胞上清と同等の力価をしめた。

3. デング熱、チクングニア熱流行地域での血清診断と分離ウイルスの分子疫学解析

116 例のデング熱疑い患者の血清抗体検査では特異的 IgM 検査において、チクングニア陽性 (5.2%)、デング陽性 (47.4%)、両方陽性 (6%) であった。特異的 IgG 検査ではチクングニア陽性 (14.6%)、デング陽性 (48.2%)、双方陽性 (7.7%) であった。ウイルス検査については 4 検体でチクングニアウイルス遺伝子陽性検体があり、C6/36 細胞接種によりウイルスが 4 株分離された。E 1 遺伝子 (遺伝子番号 9952 -11271) の塩基配列を決定し登録した (GenBank accession numbers- KF 590564, KF 590565, KF 590566, KF 590567)。これらの配列を樹状解析したところ、有史以来はじめてミャンマー国にアフリカのチクングニアウイルス ECSA 型 (East Central South African genotype) が侵入していたことが判明した。

D. 結論

1. デングウイルスの 4 つの血清型のすべてを同時に検出し得るデングウイルス共通 RT-LAMP 法を確立した。この RT-LAMP の検出限界は DEN-1, -2, -3 -4 型の代表型 について、それぞれ 1, 10, 10, 1 copy であった。デングウイルス 16 株を用いたコンセンサス RT-PCR 法との比較では 7 株で 10 ~ 100 倍高い感度、6 株では同じ感度であった。コンセンサス RT-PCR 法と他のフラビウイルスとのクロス反応はなかった。患者血清からも Consensus デング RT-LAMP でウイルスが検出でき、健康者血清からは非特異反応はなく、臨床検体からもデングウイルスを検出できた。

2. IgM 補足法によるデング特異的イムノクロマト法を作製し、ベッドサイド利用できる迅速抗体検査を開発した。この検査に用いることのできる安全なウイルス粒子様抗原を昆虫細胞で安定に発現する系を構築した。

3. ミャンマー国で臨床的にデング熱が疑われた患者の血清抗体検査により 47.4%はデングウイルス感染であることが確認できたが、5.2%はチクングニアウイルス感染であった。また 4 例ではチクングニアウイルスが分離され系統樹解析の結果、アフリカ由来の ECSA 遺伝子型が同国に侵入したことが判明した。

E. 考察

1. デングウイルスのコンセンサス LAMP デングウイルス感染症の迅速診断、フィールドサーベイランスに極めて有用であると考えられる。
2. イムノクロマト法によるデング抗体診断薬が開発でき、この診断試薬が市場に供給できれば国内でも国外でも有用であると思われる。
3. デングウイルスをはじめとして、フラビウイルス粒子様抗原は安全安価な抗原として有望であり、他のフラビウイルスやチクングニアウイルスについても同様に簡易抗体診断法を開発を継続する必要がある。
4. ミャンマー国への侵入が確認されたアフリカ由来のチクングニアウイルス(ECSA 型)は 2008 年-2009 年に近隣のマレーシア、タイ、2010 年には中国に侵入したことが確認されており、ミャンマー国へはこれらの近隣諸国から伝搬した可能性が高い。この系統のウイルスは従来のアジアで流行しているチクングニアウイルスよりも高い病原性を持つことが示されており今後、この系統のウイルスの拡大や我が国への伝搬には留意する必要がある。

F. 研究発表

1) 論文発表

Kwallah AO, et. al., A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. *J Virol Methods.* ;Vol.193(1):23-27. 2013

Ngwe Tun MM, et. al., Serological characterization

of dengue virus infections observed among dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in Upper Myanmar. *J.Med.Virol.* Vol.85:1258-1266, 2013

Hayasaka D, Aoki K, Morita K. Development of simple and rapid assay to detect viral RNA of tick-borne encephalitis virus by reverse transcription-loop -mediated isothermal amplification. *Virology Journal* Mar 4;10:68. 2013

Basu D. 他: First Isolation of Dengue Virus from the 2010 Epidemic in Nepal. *Tropical Medicine and Health* Vol. 41 No. 3: 1-9, 2013

2) 学会発表

Toru Kubo 他: Developing a panel of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays for comprehensive detection of causing viruses in pediatric severe pneumonia. *International Union of Microbiological Societies Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011*

Mya Myat Ngwe Tun 他: Dengue primary infections observed among dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in upper Myanmar. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011*

Allan ole Kwallar 他: A Real-time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Rapid Detection of Yellow Fever Virus. *Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, Japan January 23 -24 , 2013.*

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書（H23-25 年度）

チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作及び
キメラ Dengue 1 型ウイルス様粒子の作製と診断用抗原としての評価

研究分担者 小西 英二（国立大学法人大阪大学・タイ国マヒドン大学）

研究協力者 鈴木 亮介（国立感染症研究所）

山中 敦史（国立大学法人大阪大学・タイ国マヒドン大学）

研究要旨 蚊媒介性ウイルス疾患には国際感染症が多く含まれ、その中で Dengue 熱やチクングニア熱はわが国の輸入感染症例数が近年増加している。しかし、治療薬やワクチンは無い。本研究班における初年度（平成 23 年度）は、チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作を行った。2 年目（平成 24 年度）は、日本脳炎ウイルスレプリコンプラスミドを作製して 1 回感染性のウイルス様粒子（SRIP）産生系を確立し、他のフラビウイルスの表面蛋白を有するキメラ SRIP も作製できることを示した。最終年度（平成 25 年度）は、Dengue 1 型ウイルス（DENV-1）の表面蛋白を有するキメラウイルス様粒子が、本来の DENV-1 の代替抗原として中和試験及び感染増強試験に使用可能であることを示した。ウイルスの国境を超える移動の制限は大きいと、国外のウイルスが遺伝子情報のみで国内で容易に作製できる技術は有用であり、ワクチンの評価や診断系の開発、また国民のリスクアセスメントや病原性の解明などへの利用が期待される。

A. 研究目的

チクングニア熱（CHIKF）は通常は非致死性の発疹性熱性疾患であるが、必発する関節痛は数週間から数カ月にわたって続く場合があり、重症例では神経症状や劇症肝炎による死亡も報告されている。Dengue 熱（DF）は、発熱、発疹、頭痛、眼窩痛、筋肉痛、関節痛等を呈する一過性熱性疾患であるが、重症の Dengue 出血熱（DHF）は、Dengue 熱の症状に加えて血漿漏出や出血傾向、さらにショック症状を示して致死的となる。現在のところ、特異的な治療方法はなく、認可された予防ワクチンもない。

これらの疾患は熱帯・亜熱帯地域に流行するが、わが国では流行国への渡航者による輸入感染症が問題となる。そして近年、輸入感染症例数は増加している。しかも輸入感染症にとどまらず、国内流行の可能性も危惧される。これらの病気を媒介するヒトスジシマカは東北以南に生息するため、輸入感染症として帰国したウイルス血症の患者をヒトスジシマカが吸血することで、蚊にウイルスが伝播する可能性がある。ウイルス保有蚊が生じると、その刺咬によりヒトが感染を受けていわゆる国内伝播が発生する。温帯地域における国内伝播の事例

はヨーロッパの国々で報告されており、わが国でも国内伝播を示唆するDF患者発生が最近報告された。

これらの疾患に対する総合的対策の確立を目的として、初年度（平成23年度）には、CHIKVを予防するDNAワクチンを試作した。2年目（平成24年度）には、日本脳炎ウイルス（JEV）レプリコンプラスミドを作製して1回感染性のウイルス様粒子（SRIP）産生系を確立した。さらに、他のフラビウイルスの表面蛋白を有するキメラSRIPも作製できることを示した。最終年度（平成25年度）には、デング1型ウイルス（DENV-1）の表面蛋白を有するキメラウイルス様粒子（D1-SRIP）が、中和試験及び感染増強試験に使用可能であることを示した。

B. 研究方法

CHIKV ゲノム RNA : BaH306 株 (AY424803)、SL10571 株 (AB455494)、S27 株 (AF369024) のゲノム RNA は国立感染症研究所ウイルス第一部の高崎智彦室長から分与を受けた。

JEV レプリコンプラスミドの作製 : JEV 中山株のレプリコン cDNA を、CMV プロモーターと HDV リボザイム配列の間に挿入して JEV レプリコンプラスミドを作製した。pCMV-JErep は、JEV ゲノムからカプシド (C) 領域の大部分、全長の前駆膜 (prM) そして E 領域の大部分を除いた遺伝子がレプリコンとして細胞内で複製されるように設計した。一方 pCMV-JErep-fullC は、JEV ゲノムにおける全長の C 領域は保存し、全長の prM と大部分の E 領域のみを除いたレプリコンが機能するように設計された。

JEV または DENV-1 の構造蛋白質発現プラスミド : JEV 中山株あるいは DENV-1 望月株の C-E、C、prM/E 領域それぞれの cDNA を CAG プロモーター下流に挿入し

て構築した。

SRIP の感染力価測定法 : レプリコンプラスミドおよび構造蛋白領域発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、その培養上清を Vero あるいは K562 細胞に感染させ、2 日後に抗 JEV-NS1 抗体を用いた細胞染色により計数した。

中和試験 : 段階希釈した抗体と抗原 (JEV、DENV-1、JEV-SRIP、D1-SRIP) を混合し、室温で 1 時間あるいは 37°C で 2 時間保温後に Vero 細胞に感染させ、2 日後に抗 NS1 抗体を用いて細胞染色を行い、プラークまたは感染細胞を計数した。抗体を含まない陰性対照で得られた平均値からの減少率を % で表し、50% プラーク (または感染細胞) 数減少を示す希釈度 (PRNT50) を中和抗体価とした。

増強試験 : 段階希釈した抗体と抗原 (DENV-1 または D1-SRIP) を混合し、37°C で 2 時間保温した後に、準接着系 K562 細胞を加えた。2 日後に抗 NS1 抗体を用いた細胞染色を行いプラークまたは感染細胞を計数した。実験群で得られたプラーク・感染細胞数を、抗体を含まない陰性対照のプラーク・感染細胞数が 100 になるように換算した。また、これらの活性は補体レベルに依存することがあるため、補体を含む系と含まない系で行った。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用および動物実験は、当該研究機関の倫理委員会及び動物実験委員会により承認された。

C. 研究結果

CHIKV DNA ワクチンの試作及び評価 : BaH306 株、SL10571 株、S27 株のウイルスゲノム RNA から RT-PCR を行い、E1 - E3、6K 遺伝子を pcDNA3 ベクターに組込んだ。これらのプラスミドを CHO 細胞へ導入し、免疫染色により細胞内 CHIKV 抗原の発現が確認された。

JEV レプリコンプラスミドの評価：JEV レプリコンプラスミドを Huh7 細胞にトランスフェクションし、2 日後に細胞を固定し、抗 dsRNA 抗体を用いて細胞を染色すると、陽性細胞が認められた。この結果は、ウイルス RNA が細胞内で複製され、レプリコンとして機能したことを示す。

JEV-SRIP 放出の確認：JEV レプリコンプラスミドと JEV の C-E 発現プラスミドを 293T にトランスフェクションすると、3 日目の培養上清中に約 10^6 IU/ml の感染性粒子が産生された。C-E 発現プラスミドを、C 発現プラスミドおよび prME 発現プラスミドの 2 つプラスミドに分割して発現させた場合でも、同様の結果が得られた。この結果は、プラスミドのコトランスフェクションにより細胞から感染性粒子が放出されたことを示す。また、このようにして得られたウイルスを Vero 細胞に感染させても、その感染細胞の培養上清中にはウイルス感染価が認められないことから、得られたウイルスは 1 回のみでの感染性である事が確認できた。

JEV 抗体による JEV-SRIP の中和：抗 JEV ウサギ血清による JEV-SRIP の感染中和は、血清の濃度依存的に認められ、またそのレベルは JEV 中山株に対する活性と同程度であった。この結果は、JEV-SRIP の表面抗原構造が、本来の JEV のそれと同様であることを示す。

他のフラビウイルスの表面抗原を持つ SRIP の作製：DENV、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの prM/E 発現プラスミドと JEV レプリコンプラスミド、JEV C 発現プラスミドを 293T 細胞にコトランスフェクションしたところ、DENV では感染価が低かったものの、試した全てのウイルスで 1 回感染性粒子の産生が認められた。

D1-SRIP 収量を増加させる工夫：pCMV-JErep-fullC を用いて作製された

D1-SRIP の放出量を継時的に測定したところ、トランスフェクション後 3 日目ではほぼ最高値に達した。この値 (10^4 IU/ml) は、pCMV-JErep を用いて得られた感染力価 (10^3 IU/ml) より約 10 倍高値であった。この結果は、全長の C 領域遺伝子をレプリコンプラスミドに組み込む工夫により、SRIP の収量が上昇したことを示す。

D1-SRIP 抗原の増強試験における評価：D1-SRIP と Dengue 抗体陽性ヒト血清を用いて、増強試験を行なった。得られた抗体濃度依存的反応曲線は、本来の DENV-1 抗原を用いて得られた曲線と類似した。さらに希釈度 $1:10^1 \sim 1:10^6$ で得られた感染細胞数を、DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原の間で比較したところ、補体存在下でも非存在下でも、高い有意の相関を示した (相関係数は 0.95 以上 : $P < 0.001$)。

次に、抗 DENV-1 モノクローナル抗体を用いて増強試験を行ったところ、血清で得られた結果と同様に DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原の間で類似の抗体濃度依存的反応曲線が確認された。希釈度 $1:10^1 \sim 1:10^5$ で得られた感染細胞数も、補体存在下と非存在下の両条件において、DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原の間で高い有意の相関を示した (相関係数は 0.98 以上 : $P < 0.001$)。

D1-SRIP 抗原の中和試験における評価：Vero 細胞を用いた従来の中和試験でも同様の比較を行った。増強試験の結果と同様に、DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原を用いて得られた抗体濃度依存的反応曲線に大きな差異は見られなかった。さらに、PRNT50 を求めたところ、両抗原で得られた値に有意の相関が認められた (相関係数は 0.919 : $P < 0.001$)。

D. 考察

「安全保障貿易管理」や「生物多様性条約に基づくアクセスおよび利益配分」が重視される昨今、国境を超えるウイルスの

運搬には制限があり、他国で分離されたウイルスを入手することは困難となってきた。一方で、多くの海外渡航者が現地で流行しているウイルスを輸入感染症として国内に持ち込む可能性も増大しているため、診断用抗原として海外のウイルスを用いる必要性も生じる。そこで、遺伝子情報取得のみで同一表面を持つウイルスを容易に作製できる系の確立は、大きな意義を持つ。

本研究班における2年目と3年目の研究において、JEVのレプリコンcDNAをCMVプロモーター下流に挿入する事により、*in vitro*でRNA合成をする事なく、プラスミドを直接細胞に導入してJEVゲノムを複製させる事が出来た。またこの時に構造領域発現プラスミドを同時にトランスフェクションすれば、1回感染性のウイルス粒子が得られる事が明らかとなった。従って、構造領域に変異を導入したウイルスの作製を迅速、簡便に行える事が期待される。

フラビウイルス粒子表面蛋白の合成に関わるprM/E遺伝子の発現により、ニュークレオカプシドが存在しない空の粒子が細胞から放出される。この粒子はELISA等の抗体結合試験の抗原として使用可能であることが、JEV等の比較的産生量の高いウイルスでは示されている。しかし、DENVでは抗原として使用できるほどの収量が通常は得られない。一方、prM/E遺伝子の導入と同時にレプリコンプラスミドを導入すると、RNAを含むニュークレオカプシドが存在するSRIPが放出される。感染性があるため、抗原としての感度が上がり、また中和試験や増強試験等の抗体機能試験に使用可能となる。本研究の評価により、D1-SRIPはデング抗体機能試験において、ウイルスの代替抗原として使用できることが示された。

2012年に報告された世界初のデングワクチン効力評価では、中和抗体が検出されているにもかかわらず低い効力がデング2型ウイルスで示され、従来の測定法で求められた中和抗体価では必ずしも防御の指標とはならず、中和試験を改良する必要性が示唆された。中和活性と増強活性のバランスを測定する方法は、その解決策の1つである。本研究のSRIP作製系により様々な血清型・遺伝子型のウイルス抗原の作製が可能となり、これらを用いて抗体の機能試験を行うことは、将来のワクチン開発や発症機序の解明、さらに国外流行株の国内侵入時の対策に貢献することが期待される。

E. 結論

CHIKVの3株を用いて試作したDNAワクチンは、いずれも細胞内にCHIKV抗原を発現することを確認した。また、プラスミドトランスフェクションによる1回感染性JEV粒子産生系を確立した。prM/Eの配列を変える事により他のフラビウイルスとのキメラ粒子も作製できた。キメラデング1型ウイルス様粒子は、本来のウイルスの代替抗原として、デング抗体機能試験に使用可能であることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」
(H23-新興-一般-010)

分担研究報告書（H23-25 年度）

「GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発、および健常成人における細胞培養日本
脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果」

研究分担者 高橋 和郎（大阪府立公衆衛生研究所 副所長兼感染症部長）

研究協力者 青山 幾子、弓指 孝博、加瀬 哲男

（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課）

研究要旨：

1. GENECUBE®を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

GENECUBE 法によりDV, JEV は比較的高感度で検出可能であり、臨床検査への応用が可能と考えられた。WNV に対しては低感度であり今後の検討課題である。

2. 健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果

成人において日本脳炎ワクチン接種により88%の成人は有意な抗体上昇を認めたが、1年後にはその21%が陰転化した。特に、ワクチン接種前の中和抗体価が<10である群の陰転化率は37.5%と高値であった。さらに、ワクチン接種後10倍という低い中和抗体価しか獲得できなかった群（高齢者が多数を占める）では90%の人が陰性化した。以上より50歳代以上では2回接種を受けるほうが望ましいと考えられた。

健常人における日本脳炎ワクチン接種2年後の幾何平均中和抗体価はわずか9.4%まで減少し、陰転率も39%と高く1年後の陰転率の約2倍となった。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。

日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、交差反応性が認められた。Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、交差反応性が認められた。Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

A. 研究目的

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

現在、地方衛生研究所では、アルボウイルスの遺伝子診断について、患者検体および蚊やカラス検体を対象にPCR法と塩基配列の決定により確定診断を行っている。しかし、蚊の検体数は多く、検査には3-5日を要する。今般、遺伝子検査を2時間以内で判定可能な自動核酸検出装置を使用し、迅速で高感度な検出方法の開発を目的とした。この実験診断法が確立すると、地方衛生研究所では、より効率的で高性能な診断法が導入でき、より迅速な感染症対策に寄与できることが期待される。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

本邦で使用されている日本脳炎ワクチンは不活化ワクチンであるため、抗体価は接種後5~10年で低下するといわれている。厚生労働省感染症流行予測調査の結果では、40~50代の抗体保有率が低く、近年発生する日本脳炎患者の3~4割はこの年代である。また、2009年から新しい乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンが定期接種に使用されているが、成人における使用例は少なく、その効果に関する情報は少ない。そこで、本研究では、成人における新規日本脳炎ワクチン接種による抗体応答とその持続効果について解明することを目的とした。

B. 研究方法

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. 対象ウイルスとPCR法の設計

対象ウイルスはデングウイルス(DV)1-4型、ウエストナイルウイルス(WNV)、日本脳炎ウイルス(JEV)である。DVのプライマーとプローブはウイルス遺伝子の3'端近傍に位置し、4種の型に共通する配列を選定した。WNVとJEVについては、プライマーはこれらに共通する配列を選定し、プ

ローブは1塩基異なる配列の部位を選定した。

2. PCR反応と検出感度の検討

既知の力価のウイルスからRNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAを作製してKODポリメラーゼによりPCR反応を行い、プローブと反応することにより特異性が検証される。検出感度は抽出したRNAを、また上記PCR産物DNAを段階希釈することにより検討した。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1) 対象

本研究に同意を得た一般健常人272名 年齢:20~72歳(中央値43歳)に乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン(阪大微研 ジェービック V[®])を接種し、ワクチン接種前と、接種約1ヶ月後に採血を実施し、ワクチン接種により抗体が陽転した対象者のうち154名について接種1年後に再度採血を実施した。

2) 中和抗体価測定

日本脳炎ウイルス(JEV) Beijing-1株に対する中和抗体価を50%フォーカス減少法(FRNT₅₀)を用いて測定した。このとき、血清希釈10倍以上で中和活性を示した血清を中和抗体陽性とした。幾何平均抗体価は、中和抗体価10倍未満を0.5として算出した。

なお、本研究は大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査委員会で承認を受けており、検体提供者へはインフォームドコンセント及び検体の匿名化など倫理面への配慮がなされている。

C. 研究結果

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. ウイルス遺伝子の検出と検出感度の検討

DVは1-4型すべて検出可能であった。検出感度は4型が10コピー、3型が100コピーで、1,2型は今後精査し行う予定である。最少検出ウイルス力価は1型 2.3×10^{-2} PFU, 2型 6.0×10^{-4} PFU, 3型 3.2×10^{-3} PFU, 4型 2.3×10^{-2} PFUであった。

JEV Beijing-1 株に対する検出限界は、 1.0×10^{-2} FFU であった。

WNV NY株に対する検出限界は、NY株のPCR産物をテンプレートとした場合 10^4 コピーと非常に低感度であった。

[健全成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1. ワクチン接種前後の JEV に対する中和抗体価

日本脳炎ワクチン接種者 272 名のうち、104 名 (38%) はワクチン接種前より JEV に対する中和抗体を保有していた。1 回のワクチン接種により JEV 中和抗体価が 2 倍以上上昇したのは 239 名 (88%) で、JEV に対する幾何平均抗体価は接種前 2.7 倍、接種後 50.4 倍と約 19 倍の有意な上昇が認められた。ワクチン接種前より抗体を保有していた 104 名は、接種により全員 2 倍以上抗体価が上昇した。

2. ワクチンにより誘導された抗体価の持続性

ワクチン接種者 272 名のうち接種後抗体価が 10 以上であり、2 年間継続調査ができた全 142 名の幾何平均抗体価の推移は、ワクチン接種 1 か月後 91.7 から 1 年後には 20.9 と約 1/4 に低下し、2 年後には 8.59 と約 1/10 に低下した (表 1)。1 年後に抗体価が <10 となった陰転率は 23% であったが、2 年後には 39% (56/142) が陰転した。接種後 160 倍以上の対象者では陰転化した例は認められなかった。

142 名の対象者のうち、ワクチン接種前中和抗体価が ≥ 10 (n=59) と <10 (n=83) の 2 群に分けると、ワクチン接種 1 か月後では幾何平均抗体価はそれぞれ 305, 39 であったが、2 年後にはそれぞれ 77, 1.8 と減少し、それぞれ 25%, 4.6% に減少した。2 群における抗体価の差は、接種 1 か月後は 7.8 倍であったが、2 年後には 43 倍と差がさらに拡大した。2 群での抗体価の差はいずれの時期も有意差が認められた。

上記 2 群におけるワクチン接種 1 および 2 年後の抗体陰転率を検討した。ワクチン接種前

の中和抗体価が ≥ 10 であった 59 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 1 例 (1/59, 1.7%) であった。この例はワクチン接種前抗体価 10 で、接種後 1 か月の抗体価が 20 と低抗体価の例であった。接種 2 年後に陰転した例は認められなかった。一方、接種前の中和抗体価が <10 である 83 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 32 例 (32/83, 38.5%) であり、1 年後に陰転化した 33 例の 97.0% を占めた。2 年後さらに陰転化した例は 23 例で、総計 55 例が陰転化し、陰転率は 66% (55/83%) であった。陰転化した総数 56 例の 98% を占めた。

3. 年齢群別の中和抗体価の持続状況について

接種 1 か月後、2 年後の年齢群別幾何平均抗体価は、接種前抗体の有無に分けた 2 群ともに、年齢が上昇するにつれて低下した (例外は 20 歳代で接種前抗体が陰性の群のみ)。年齢群別の抗体価減少率は接種前抗体陽性群は年齢と関係なく 70-80% であったが、接種前抗体陰性群では年齢と共に減少率は増加した。さらに、各年齢群別の抗体陰転率は年齢と正の相関を示し、20 歳代が 33% であったが、50-61 歳代では 78% と大きく増加した。

[日本脳炎ウイルス亜型に対する中和抗体の交差反応性]

ワクチン接種者 272 名のうち接種後抗体価が 10 以上の陽性者のうち 24 例について、日本脳炎ウイルス G1 および G5 遺伝子型に対する交差中和抗体価を測定した。その結果、Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、抗体価は G1 株に対して約 50%, G5 株に対しては約 11% と低下した。Beijing-1 株と G1 株に対する抗体価は正の相関が認められたが、G5 株に対しては相関が認められなかった。

D. 考察

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. GENECUBE 法による DV に対する検出感度は 10-100 コピー(DV3,4 型)であり、ウイルス力価として 1 型 2.3×10^{-2} PFU, 2 型 6.0×10^{-4} PFU であった。また、JEV Beijing-1 株に対する検出限界は、 1.0×10^{-2} PFU であったことから、これらウイルスに対する検出限界は コピー数としては 10-100 コピー程度と推定されるので、遜色ない感度と考えられる。

2. WNV に対しては低感度であり、使用した WNV NY99 株のプライマーとプローブの塩基配列に変異があることも推定されるので、今後の検討課題である。

[健全成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

今回使用した細胞培養由来ワクチンは成人でも 100% のブースター効果がみられ、有効性が確かめられた。また、陽転率は 80.4% となり、成人に対する接種も有効であることが確認できた。陽転率は年齢とともに低下することから、年齢により免疫応答能が低下していることが示唆された。また 60 代以上では低年齢でのワクチン接種歴がない場合が多く、初期免疫がないために抗体価が上昇しにくい可能性が考えられた。本研究において、ワクチン 1 回および 2 回接種後の総陽転率は 93.8% であり、初回 2 回接種後の小児の陽転率が 99.2% (添付文書記載) であることと比較すると、成人での陽転率は十分高いと考えられる。ただし、一回の接種で抗体価が 10 倍以下で上昇しない場合が 1 割ほどあることが想定され、50 代以上では 2 回接種が望ましいと考えられた。

本研究班の研究結果では、健全成人において、日本脳炎ワクチンの 1 回接種により接種 1 か月後に中和抗体陽性者 (≥ 10) は 88% となり、その中和抗体陽性者では 1 年後の抗体価は 23% に減少し、陰転率は 23% であった。2 年後の抗体価はさらにわずか 9.4% まで減少し、陰転率も 39% と高く 1 年後の陰転率の約 2 倍となった。日本脳炎の発症を阻止する最少中和抗体価については結論が

得られていないが、中和抗体価 10 は十分な発症阻止抗体価であると考えられている。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は 2 回接種が勧められ、1 回接種の場合は、旅行者ワクチンとして 1 年後も接種を受けることが勧められる。

ワクチン接種前の中和抗体の保有の有無の観点から 2 群における抗体価の減少を検討すると、接種前中和抗体陽性群では、陰性群と比較して 2 年後の幾何平均抗体価の減少率 (25% vs 4.6%)、陰転率 (1.7% vs 66%) ともに有意な差を認め、抗体価が維持されていた。この事実はワクチン接種後の抗体の持続能にワクチン接種前の免疫記憶能が大きく影響を与えていることを示唆している。本研究では被接種者におけるワクチン接種歴は明確に調査できなかったため不明である。接種前中和抗体陽性群は小児期での日本脳炎ワクチン歴が十分であり、陰性群はワクチン歴がないか不十分であるか、あるいは 1 次、2 次ワクチン不全者と考えられる。

中和抗体価の経時的減少について年齢群別に検討すると、2 年後の年齢群別幾何平均抗体価は、接種前抗体保有の有無に関わらず年齢と逆相関を示した。免疫応答能、免疫記憶能は年齢とともに低下することを反映している。

[日本脳炎ウイルス亜型に対する中和抗体の交差反応性]

本研究結果では、日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、抗体価は G1 株に対して約 50%, G5 株に対しては約 11% と低下した。しかし、Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられる。

E. 結論

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. GENECUBE 法によりDV, JEV は比較的高感度で検出可能であり、臨床検査への応用が可能と考えられる。WNV に対しては低感度であり今後の検討課題である。

[健康成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1. 本研究結果から、成人において日本脳炎ワクチン接種により88%の成人は有意な抗体上昇を認めたが、1年後にはその21%が陰転化した。特に、ワクチン接種前の中和抗体価が<10である群の陰転化率は37.5%であった。さらに、ワクチン接種後10倍という低い中和抗体価しか獲得できなかった群(高齢者が多数を占める)では90%の人が陰性化した。以上より50歳代以上では2回接種を受けるほうが望ましいと考えられた。
2. 健康人における日本脳炎ワクチン接種2年後の幾何平均中和抗体価はわずか9.4%まで減少し、陰転率も39%と高く1年後の陰転率の約2倍となった。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。
 1. 日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均

抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、交差反応性が認められた。Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

F. 健康危機情報

近年、40～50 代の日本脳炎患者報告も増加し、2011 年には日本脳炎の輸入症例が報告された。今後、抗体保有率の低い年代については、ワクチンの追加接種を考慮する必要があると考えられる。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」

(H23-新興-一般-010)

分担研究報告書（H23-25 年度）

媒介蚊からの簡便な病原体ゲノム検出、流行地における媒介蚊のナトリウムチャンネル遺伝子調査、
および日本の新規媒介蚊の確定

研究分担者	江下優樹	大分大学医学部感染予防医学講座 准教授
研究協力者	福田昌子	大分大学医学部感染予防医学講座 助教
	Lucky R. Runtuwene	大分大学医学部感染予防医学講座 大学院博士課程 3 年
	小林隆志	大分大学医学部感染予防医学講座 教授
	Rawewan Srisawat	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 科学者
	Narumon Komalamisra	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 准教授
	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス 1 部 室長
	倉根一郎	国立感染症研究所 副所長

研究要旨

感染蚊からウイルスゲノムを RT-LAMP 法で簡便化を計り、反応時間の短縮および長波長 UV ライトの使用により目視検査で陰・陽性の区別が明確となった。また、RNA の精製過程を省略しても陽性の結果が得られること、さらに携帯型長波長 UV ライトを使用することによって、設備の整っていない流行地においても迅速な RT-LAMP 法が実施可能となった。

デング熱流行地で採集したネッタイシマカ幼虫を羽化させた後、ペルメトリン耐性蚊に存在するナトリウムチャンネル遺伝子の IIS6 の部分断片を、RT-PCR 法で増幅させ、配列決定を行ったところ、4 つの塩基変異が検出された。これら 2 ヶ所の突然変異部位について詳細を解析した結果、ペルメトリン耐性ネッタイシマカの野外集団が既に生じていたことが明らかとなった。

レユニオン島由来のチクングニアウイルスによる日本国内輸入症例が報告されていることから、国内のヒトスジシマカおよびその近縁媒介蚊種、リバーズシマカとヤマダシマカの本ウイルス感受性を検討したところ、前述の 2 種に本ウイルス感受性があることが明らかとなった。わが国固有の蚊種であることから、本ウイルスが国内に侵入した際は、ヒトスジシマカのみならず、これら蚊種の対策も考慮する必要がある。

A. 研究目的

1. 流行地でウイルスに感染した蚊の動態を把握して早期に駆除することは、患者発生を未然に防ぐ方策にもつながる。このために、採集蚊からの病原体検出を迅速に行う必要がある。RT-LAMP

法の更なる簡便化計った。

2. ピレトロイド系薬剤は、ヒトや哺乳動物に対する毒性が低いことから広く使われている。タイでは、24 時間以内に患者宅の周囲地区にデルタメトリンあるいはペルメトリンを噴霧し、近傍

に生息する全ての蚊成虫を殺処分している。しかし、殺虫剤抵抗性の蚊に関する情報は少ない。薬剤耐性が蚊で生じる要因として、電位開口型ナトリウムチャンネル遺伝子の感受性の変化がある。この遺伝子の1塩基置換は、ピレトロイドに対する標的部位耐性を誘発する。本研究では、野外で採集したネッタイシマカにおけるペルメトリン耐性と関係のある *kdr* 遺伝子の IIS4-6 ドメインにおける突然変異の頻度を検討した。

3. レユニオン島由来のチクングニアウイルスは、2006年12月に2例の輸入症例が日本国内で初めて報告された。本症の主媒介蚊はヒトスジシマカとされていることから、日本国内に生息するヒトスジシマカの近縁種を含む蚊2種の本ウイルス感受性を実験的に検討した。

B. 研究方法

B. 1. 調査方法

1. 供試蚊：日本国産ヒトスジシマカおよびタイ国産ネッタイシマカ雌成虫を使用した。

蚊乳剤の作製：2%MEMを用いて蚊乳剤を作製し、その遠心・上澄み液を原液として試験に用いた。

供試ウイルス：国立感染症研究所より分与されたチクングニアウイルス SL11131 を用いた。

試験方法：10倍希釈系列を準備して蚊乳剤とウイルスの混合液を準備した。

RT-LAMP法：栄研科学(株)のRNA増幅試薬キット(RT-LAMP)を用いた。

RT-PCR法：Invitrogen社のOne-step RT-PCR試薬を用いた。

2. ペルメトリン耐性ネッタイシマカが報告されている地区で採集した。羽化成虫に0.75%ペルメトリンを1時間暴露させて生存した成虫をペルメトリン耐性と判断した(WHO判断基準)

2.1. 殺虫剤感受性試験

羽化後2-5日の未吸血雌蚊を使って、WHO標準手順に従って殺虫剤感受性試験を行った。なお対

照区の蚊の死亡率が20%を超えたら、実験を終了した。

2.2. 薬剤耐性ネッタイシマカの *kdr* を調べるために、PCR生成物を精製し、Automated DNAシーケンサー(PE Applied Biosystems)を使い、Macrogen Inc., Koreaが配列決定した。

2.3. ペルメトリン暴露時間に対する2つの突然変異の影響を調べた。

3.1 蚊の飼育：蚊の飼育は、25°C・1日の日長16時間の飼育室で行った。

3.2 供試蚊：継代飼育虫の奄美大島産のリバースシマカと長崎産ヤマダシマカを用いた。実験には、羽化7日経過後の雌成虫を使用した。

3.3 供試ウイルス：レユニオン島由来のチクングニアウイルスからストックウイルス液(ウイルス力価： 3×10^8 PFU/mL)を準備した。

3.4 蚊の感染実験：感染実験は大阪大学の動物実験委員会から事前に承認を得て、BSL3施設で実施した。蚊の胸部へのウイルス接種：接種装置を用いて、蚊の胸部にウイルス液を約0.1 μ L接種した。蚊の経口摂食によるウイルス感染：速遠心で上澄みを除いたpacked cell(採血時の血液量の約半分)に対して、蔗糖(試薬特級、和光純薬)を最終濃度2%になるように加えた。その後、チクングニアウイルス液を等量加えて混合した。

3.5. RT-PCR法によるチクングニアウイルスのゲノム検出には、TRIzol[®]試薬(Invitrogen, Carlsbad, USA)とRNaeasy mini kit(Qiagen)を組合せて、蚊個体から全RNAを抽出した。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

1.1. RT-LAMP法による蚊乳剤中のウイルスゲノム検出：反応液中に、ウイルス力価を含む蚊

乳剤のいずれにおいても、RT-LAMP 法の目視で蛍光を観察した。

1.2. RT-PCR 法による蚊乳剤中のウイルスゲノム検出： RNA 未精製の蚊乳剤の濃度が高い反応液では、PCR 産物の増幅は認められなかった。蚊乳剤の濃度が薄くなると、特異的な増幅が RT-PCR で認められた。

2.1. 採集したネッタシマカは高いペルメトリン耐性を示した。また、生存した耐性ネッタシマカ個体のナトリウムチャンネル遺伝子にヌクレオチド置換が検出された。

3.1. ウイルスを蚊の胸部に接種した際の蚊の感染結果では、リバーズシマカとヤマダシマカも本ウイルスに感受性をもつことが示唆された。

3.2. 蚊が経口的にウイルスを吸液した際の蚊の感染結果では、同様に 2 種蚊から、ウイルスゲノムが検出されたことから、本 2 蚊種のチクングニアウイルス感受性が明らかとなった。また、ヤマダシマカの脚から本ウイルスゲノムが検出されたことから、ウイルス媒介能を有することが示唆された。

D. 考察

1. RNA 未精製の蚊乳剤を使っても、RT-LAMP 法では、目的の増幅産物を得ることができた。これは *Bst* DNA Polymerase の特性に由来すると考えられた。また、RNA 未精製の蚊乳剤を用いても、目視検査を行うことが可能であった。

2.1. タイ国の野生ネッタシマカ集団で、高レベルのペルメトリン耐性が認められた。ペルメトリンと相乗剤を併用することが、もう一つ考えられる手段である。耐性集団での耐性アレルの出現頻度は、タイ国の蚊集団で *kdr* 耐性アレルの頻度が上昇していることを示す徴候がある。タイ国では、ピレトロイドの使用が続いていること、および、異なる殺虫剤クラス間の交差耐性が生じるのを避けることを考えれば、そのような情報は不可欠のものである。ある国が、媒介昆虫対策とし

てピレトロイドに頼るのであれば、ネッタシマカの耐性集団が生じることは、媒介昆虫対策プログラムにとって懸念されることとなる。

3.1. リバーズシマカとヤマダシマカがチクングニアウイルスに対して感受性を有することを、胸部接種法と経口摂食法によって、実験的に証明した。

蚊の人工吸血方法には種々の方法が報告されているが、リバーズシマカとヤマダシマカは、マウスよりもヒトからの吸血嗜好性が高いように思われる。我々は、チクングニアウイルスを接種した種々の遺伝子ノックアウトマウスを用いた検討を始めている。この方法が確立されると経口感染実験はより容易であり、満腹吸血の蚊を使用すれば、比較的定量性のある結果が導き出せると思われる。

我が国において、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、リバーズシマカの 3 蚊種のヒトとの接触度合いは、それぞれの蚊種の生息域から考えると、ヒトスジシマカが最も高く、ヤマダシマカ、リバーズシマカの順となる。日本の本州ではヒトスジシマカがチクングニアウイルスの主要な媒介蚊と言うことは言えるかも知れない。しかし、南西諸島や琉球列島の島々は森林に覆われている地域が多いので、これらの地域ではリバーズシマカとヒトとの接触度合いは、都会よりも高いことが推察されることから、媒介蚊対策を講じる際は考慮する必要がある。

E. 結論

1.1. 蚊乳剤から RNA を精製しなくても RT-LAMP 法で目的の増幅産物を得ることが出来た。

1.2. 蛍光・目視検出試薬を反応液に加えた際は、長波長のブラックライトが有効であったことから、携帯用の市販品を見つけることが出来たので、フィールド調査には有効であろう。

1.3. 感染症の流行地で RT-LAMP 法を行う場合は、反応試薬中に、蚊ホモジネート、蛍光・目視

検出試薬などを加えて、30～45 分後に携帯型の長波長ブラックライトを用いて陽性の有無を調べる事が可能となった。

2.1. 野外で採集した幼虫を実験室に持ち帰り、羽化した成虫を用いて、薬剤試験を行ったところ、ペルメトリン耐性の点突然変異が 4 箇所で見つかった。

2.2. これらのアミノ酸置換が、ペルメトリン耐性ネッタイシマカ. の野外採集集団に生じていたことが明らかになった。

3.1. 蚊の胸部接種法と経口摂食法によるチクングニアウイルス感染実験を行い、日本に生息するリバーズシマカとヤマダシマカの雌成虫が、本ウイルス感受性を持つ事が明らかとなった。

3.2. 我が国における上記の蚊 2 種の分布生息域および蚊の感受性から疫学的意義を考察した。

F. 健康危険管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yusuke Sayama, Yuki Eshita, Takuya Yamao, Miho Nishimura, Tomomitsu Satho, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Kouji Sakai, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa and Tetsuya Mizutani (2011): Prevalence of Phasi Charoen virus in female mosquitoes. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 3(1): 19-21.

(2) Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Theerawit Phanphooong, Tomohiko Takasaki, Lucky Ronald Runtuwene, Ichiro Kurane, Hironari Narita, Yuki Eshita (2011): Present status of the insecticide susceptibility of *Aedes* mosquitoes in Thailand. *Journal of Japanese Red Cross Toyota College of Nursing*,

6(1): 31-37.

(3) Tomomitsu SATHO, Yuki NAGANO, Yuki ESHITA, Yujin HISATOMI, Akira SAKATA, Takeshi MIYATA, Nobuhiro KASHIGE, Fumio MIAKE, Lucky R RUNTUWENE, Shuetsu FUKUSHI, Masayuki SAIJYO, Ichiro KURANE, Shigeru MORIKAWA and Tetsuya MIZUTANI (2012): Inhibitory effects of JNK on *Aedes albopictus* early larval development. *Urban pest management*, 2(1): 7-13.

(4) Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Chamnarn Apiwathnasorn, Pungasem Paeporn, Sittiruk Roytrakul, Yupha Rongsriyam, Yuki Eshita (2012): Field-collected permethrin-resistant *Aedes aegypti* from central Thailand contain point mutations in the domain IIS6 of the sodium channel gene (KDR). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 43(6): 1380-1386, 2012.

(5) Lucky Ronald Runtuwene, Eiji Konishi, Atsushi Yamanaka, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2014): Novel method for mass-infecting *Aedes aegypti* with dengue virus type 2. *Parasites & Vectors* (投稿済、査読後の修正原稿準備中)

2. 学会発表

(1) 鳥羽聡史、甲斐直子、阿南栄一朗、岡 宏亮、横山 敦、大谷哲史、石井 寛、岸 建志、白井 亮、時松一成、平松和史、山田健太郎、アハメド・カムルディン、江下優樹、西園 晃、門田淳一 (2011) : 当科で経験したデング熱の一症例。大分感染症研究会 第48回例会。2011年3月24日。大分東洋ホテル, 大分市。大分感染症研究会 第48回例会プログラム。

(2) Lucky R. Runtuwene, Atsushi Yamanaka, Eiji Konishi, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki,

Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2011): Novel method using mice to infect *Aedes aegypti* with dengue virus type 2. 第63回日本衛生動物学会大会、2011年4月14日(木)・16(土)、国立感染症研究所、一橋記念講堂 東京都。Med. Entomol. Zool., 62 (大会特集号):74, 2011.

(3) 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 高崎智彦, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, Boualy Kheokhamphavanh, Bounpone Sidavong, Kham Thong, Silivanh Chanthavong, Khambang Silavong, Kalounna Keokenechanh, Hongkham Keomanila, 牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 前田龍一郎, 森田公一, 杉本千尋, 倉根一郎 (2011) : RT-LAMP法を用いた蚊からのデングウイルスゲノムの迅速検出。第63回日本衛生動物学会大会、2011年4月14日(木)・16(土)、国立感染症研究所、一橋記念講堂 東京都。Med. Entomol. Zool., 62(大会特集号):75, 2011.

(4) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2011): Whole transcriptome analysis of *Aedes aegypti* 14 days post-dengue infection using RNA-seq. 第64回日本寄生虫学会南日本支部大会・第61回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2011年11月3日(土)・4(日)、宮崎県宮崎市 宮崎市民プラザ。第64回日本寄生虫学会・第61回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨:22, 2011. Med. Entomol. Zool., 63(2), 2012.

(6) 江下優樹, ルッキー R. ルントウェネ, 川島秀一, 鈴木 穰, 菅野純夫, 中井謙太, 前田龍一, 杉本千尋, 高崎智彦, 倉根一郎 (2011): デングウイルス感染蚊の網羅的トランスクリプ

トーム解析。第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京都新宿区、国立感染症研究所 共用第一会議室、第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会・プログラムプログラム講演要旨:5, 2011.

(6) 江下優樹, ルッキー R. ルントウェネ, 川島秀一, 鈴木 穰, 菅野純夫, 中井謙太, 前田龍一, 杉本千尋, 高崎智彦, 倉根一郎 (2011): デングウイルス感染蚊の網羅的トランスクリプトーム解析。第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京都新宿区、国立感染症研究所 共用第一会議室、2011年11月11日、第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会・プログラムプログラム講演要旨:5, 2011.

(7) 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 高崎智彦, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, 牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 今田美穂子, 前田龍一郎, 森田公一, 杉本千尋, 倉根一郎 (2012) : RT-LAMP法を用いた蚊からのアルボウイルスゲノムの迅速検出。第64回日本衛生動物学会大会、2012年3月30日(金)・31(土)、信州大学、長野県上田市。Med. Entomol. Zool., 63 (大会特集号):64, 2012

(8) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2012) : Whole transcriptome analysis comparison of *Aedes aegypti* 6- and 14-day post-dengue infection using RNA-seq. 第64回日本衛生動物学会大会、2012年3月30日・31、信州大学、長野県上田市。Med. Entomol. Zool., 63 (大会特集号) :64, 2012.

(9) Lucky R. Runtuwene¹, Shuichi Kawashima², Yutaka Suzuki³, Sumio Sugano³, Kenta Nakai⁴, Ryuichiro Maeda⁵, Chihiro Sugimoto⁶, Tomohiko Takasaki⁷, Ichiro Kurane⁷ and Yuki Eshita¹ (20

12): Validation of 40S ribosomal protein 17S as internal control for qRT-PCR of dengue-infected *Aedes aegypti*. 第65回日本寄生虫学会南日本支部大会・第62回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2012年11月10日(土)・11(日)、長崎県長崎市、長崎大学医学部ポッセ会館。第65回日本寄生虫学会・第62回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨:2012. Med. Entomol. Zool., 64(2), 2013.

(10) 江下優樹¹, Lucky R. Runtuwene¹, 大塚靖¹, 松原祥恵¹, 小林隆志¹, 川島 秀一², 服部正策³, 倉石 武³, 甲斐智恵子³, Raweewan Srisawat⁴, Narumon Komalamisra⁴, Yupha Rongsriyam⁴, Arthur E. Mongan⁵, 前田龍一郎⁶, 杉本千尋⁷, 牛島廣治⁸, 高崎智彦⁹, 倉根一郎⁹ (2012): リバーズシマカの系統確立および奄美大島・鹿児島県佐多岬でのその生息環境。第65回日本寄生虫学会南日本支部大会・第62回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2012年11月10日・11、長崎県長崎市、長崎大学医学部ポッセ会館。第65回日本寄生虫学会・第62回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨:2012. Med. Entomol. Zool., 64(2):2013.

(11) Yuki Eshita, Lucky R. Runtuwene, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane (2012): New emerging technology for use in vector control. Joint International Tropical Medicine Meeting 2012 (JITMM 2012) and The 7th Seminar on Food - and Water - Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ7). 12-14 December, 2012. Centara Grand & Bangkok Convention Centre At CentralWorld, Bangkok, Thailand. Symposium session on S34 Entomological approaches for the study of

arboviruses. Abstract of Joint International Tropical Medicine Meeting 2012 (JITMM 2012)

(12) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2013): The application of next generation sequencer in investigating the relationship of dengue virus and its vector. 第6回寄生虫感染免疫研究会、2013年3月8日(金)・9(土)、大分県由布市、大分大学医学部看護学科棟。第6回寄生虫感染免疫研究会プログラム講演要旨:22, 2013

(13) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2012): Validation of RNA-seq Data Using qRT-PCR. 第65回日本衛生動物学会大会、2013年4月6日(土)・7(日)、酪農学園大学、北海道江別市。Med. Entomol. Zool., 64 (大会特集号):40, 2013.

(14) 江下優樹, 松原祥恵, Lucky R. Runtuwene, 野口香緒里, 川上絵理, 大塚靖, 福田昌子, 小林隆志, 高崎智彦, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Bouasy Hongvanthong, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 今田美穂子, 前田龍一郎, 森田公一, 杉本千尋, 倉根一郎 (2013): 節足動物媒介性ウイルスの迅速検出への RT-LAMP 法の改良。日本家屋害虫学会 第34回大会・総会、2013年6月22・23、日本大学生物資源科学部、神奈川県藤沢市。

(15) Yuki Eshita, Lucky R. Runtuwene, Sachie Matsubara, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Masako Fukuda, Yasushi Otsuka, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, Arthur E. Mongan, Josef Tuda, Mihoko Imada, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki,

Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Hironari Narita, Hiroshi Ushijima, Koichi Morita, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane (2013) : INOVATIVE TECHNOLOGY FOR USE IN VECTOR CONTROL. “The 1st conference on Asian pediatric infectious diseases (第1回アジア小児感染症会議)”、2013年8月24・26、東京大学医学部3号館N101室、東京都文京区。

(16) Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga¹, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita¹ (2013) : Comprehensive Gene Expression Analysis of Dengue-Infected Mosquitoes. “The 1st conference on Asian pediatric infectious diseases (第1回アジア小児感染症会議)”、2013年8月24・25・26、東京大学医学部3号館N101室、東京都文京区。

(17) Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Junya Yamagishi, Mihoko Imada⁴, Ryuichiro Maeda, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013) : Comprehensive gene expression analysis of dengue-infected *Aedes aegypti* and novel anti-viral proteins in *Aedes aegypti*. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12日-14日、インドネシア国マナド市サムラトランギ大学。

(18) Yuki Eshita, Lucky Runtuwene, Masako Fukuda, Yasushi Otsuka, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Rawewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Mihoko Imada, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Hiroshi Ushijima, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki (2013) : APPLICATION OF NEW TECHNOLOGIES FOR USE IN VECTOR CONTROL. Professor Polly Roy Group Reunion for

celebrating 30 years of research in the Roy Laboratory, The Queen’s College, University of Oxford, 13-15 September, 2013. 2013年9月13日(木)-15日(日)、英国オックスフォード市オックスフォード大学クイーンズコレッジ。

(19) 江下優樹、福田昌子、Lucky Runtuwene、大塚 靖、野口香緒里、川上絵理、徳永暁憲、小林隆志、服部正策、Rawewan Srisawat、Narumon Komalamisra、牛島廣治、倉根一郎、高崎智彦 (2013) : 本邦産 *Aedes (Stegomyia) scutellaris* グループ蚊 2 種のチクングニアウイルス感受性。第66回日本寄生虫学会南日本支部大会・第63回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2013年11月2日(土)・3(日)、大分県大分市、大分大学医学部臨床講義棟1F 臨床中講義室。第66回日本寄生虫学会・第63回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨 : 9, 2013. Med. Entomol. Zool., 64(2) , 2013.

(20) Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013) : Potential novel anti-viral proteins in *Aedes aegypti*. 第66回日本寄生虫学会南日本支部大会・第63回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2013年11月2日・3、大分県大分市、大分大学医学部臨床講義棟1F 臨床中講義室。第66回日本寄生虫学会・第63回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨 : 10, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書（H23-25 年度）

ヒトスジシマカのデングウイルス感受性の評価およびジェノタイピング法による媒介蚊の殺虫剤感受性評価に関する研究

研究分担者 澤邊京子（国立感染症研究所 昆虫医科学部長）
研究協力者 佐々木年則，葛西真治，斎藤一三，伊澤晴彦，鍬田龍星
（国立感染症研究所 昆虫医科学部）
比嘉由紀子，皆川昇（長崎大学熱帯医学研究所 病害動物部）
Arlene G. Bertuso（フィリピン大学マニラ校・寄生虫学講座）
田島茂、高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

研究要旨

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的防除法の確立を目指し、デングウイルスの国内産ヒトスジシマカにおける感受性を評価した。デングウイルス 1 型（DENV1）および 2 型（DENV2）を径口的に摂取させたヒトスジシマカから TaqMan プローブ法により、4 型（DENV4）以外のウイルス型のウイルスゲノム RNA が検出された。次いで、免疫蛍光抗体法をによりウイルス粒子を検出した結果、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸で確認されたが、DENV1 は観察されなかった。SYBR Green 法により国内外のヒトスジシマカのウイルス感受性を評価した結果、ヒトスジシマカのすべての系統で DENV1 は非常によく増殖したが、DENV2 の増殖率は低く、特にネッタイシマカでの増殖はほとんど確認できないほどであった。蚊種および系統によって DENV 感受性に差異はあると思われるが、少なくとも本研究で用いた国内産ヒトスジシマカにおいて、デングウイルスの増殖が確認されたことから、国内にデング熱が侵入した場合、小規模なアウトブレイクが起こる可能性はあると考えるべきであろう。また、国内でデング熱の患者が発生した場合には、患者宅周辺の蚊の密度調査を行うと同時に、殺虫剤を用いた迅速な蚊の防除を行うことが必要となる。

そこで、殺虫剤抵抗性遺伝子の変異領域をターゲットにしたジェノタイピング法により、媒介蚊の殺虫剤抵抗性を評価した。フィリピン国内で採集したネッタイシマカにおいて、薬剤感受性レベルを裏付けるように作用点ナトリウムチャンネルが変異した個体（V1016G および F1534C）が高頻度で見つかった。その一方で、抵抗性レベルが高いにもかかわらず *kdr* 遺伝子頻度が低い集団も確認された。作用点変異を指標にしたジェノタイピング法がある程度薬剤感受性の状況を反映していることが明らかになったが、*kdr* 因子以外の抵抗性要因がネッタイシマカのピレスロイド系殺虫剤抵抗性に関与していることも示唆された。今後は、ヒトスジシマカにおける作用点と解毒酵素の双方の突然変異をターゲットとしたジェノタイピング法を検討していく必要がある。

A. 研究目的

デング熱は地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり、流行地拡大が最も危惧される感染症である。我が国のデング熱輸入症例は年々増加し、2010年には220症例を超え、2013年は合計で249例を記録した。2013年9月には、日本各地を旅行したドイツ人女性が帰国後にデング熱を発症した。患者は日本国内で蚊に刺されたことを記憶していたこともあり国内感染が疑われた。日本国内にすでにデング熱が侵入している可能性が強く示唆された。ヒトスジシマカは日本国内に普遍的に分布するのみならず、その分布域を北に拡大させており、国内のヒトスジシマカのデングウイルス媒介能を正確に把握することが急がれる。

一方、デング熱の流行地においてはネッタイシマカは主要な媒介蚊であり、世界中の熱帯・亜熱帯地域に広く分布している。近年、成虫防除に用いられるピレスロイド系殺虫剤に抵抗性を発達させた個体群が世界各地で確認されて問題となっている。媒介蚊対策が殺虫剤による防除に頼らざるを得ない現状から鑑みると、抵抗性の発達はそのまゝ感染症に対するリスクを高めることに繋がる。野外における媒介蚊の殺虫剤感受性を把握することは、殺虫剤の防除効果を高める上で重要である。そこで、薬剤抵抗性遺伝子変異を指標としたジェノタイピング法を確立し、野外集団の薬剤感受性の状況を迅速かつ簡便に把握することを目標とした。

B. 研究方法

1. 媒介蚊のデングウイルス感受性評価

ヒトスジシマカは、2010年川崎市生田(IKT系統)、2011年神奈川県海老名市(EBN系統)、2012年ベトナム・ホーチ

ミン市(HCM系統)でそれぞれ捕集された雌成虫から採卵し、その後実験室内で維持された系統を用いた。ネッタイシマカLBN系統は、2010年フィリピン・ロスバニョス市捕集の室内維持系統である。

デングウイルス1型(DENV1)は、タイ・バンコク市(D1 11-120株)、デングウイルス2型(DENV2)は、インドネシア・バリ島から帰国した患者血清よりそれぞれ分離された(D2 11-122/1株)。加えて3型(DENV3)および4型(DENV4)も使用した(ウイルス1部から分与)。

脱繊維血と混合した $10^5 \sim 10^6$ コピー/mlの力価のウイルス液を人工膜吸血法により経口的に蚊に摂取させ、感染蚊を27°C長日条件のインキュベーター内に約20日間維持した。ウイルスRNAは、TaqManプローブ法(Callahan *et al.*, 2001)、あるいはSYBR Green法(Callahan JD *et al.*変法)により検出した。次いで、免疫蛍光抗体法により、蚊の各器官におけるウイルスの存在を顕微鏡下で観察した。

2. ジェノタイピング法による媒介蚊の殺虫剤感受性の評価

2009年~2010年にフィリピン国内の古タイヤより採集したネッタイシマカ幼虫から個別にDNAを抽出し(REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit, Sigma-Aldrich)、4カ所のアミノ産置換をターゲットとして2組のPCR(I1011MorV, L1014F, V1016G, F1534C)を行った。I1011MorV, L1014F, V1016Gを検出するためにaegSCF20/aegSCR21プライマーセット、F1534Cを検出するためにaegSCF7/aegSCR7のプライマーセットを用いて各遺伝子断片を増幅した。シーケンス解析には、I1011MorVおよびL1014F検出用としてaegSCF3プライマー、V1016G用にaegSCR22プライマー、F1534C検出用にaegSCR8プライマーを

それぞれ使用した。

C. 研究結果

1. 媒介蚊のデングウイルス感受性評価

TaqMan プローブ法により、ヒトスジシマカに経口的に感染させた DENV1 および DENV3 は、いずれも 1 コピーまで検出可能であり、DENV2 も検出されたが、DENV4 は検出できなかった。DENV2 特異的抗体を反応させた免疫蛍光抗体法により、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸においてウイルス粒子の存在が確認されたが、DENV1 は確認できなかった。

次に、SYBR Green 法により、蚊のウイルス感受性を評価した。唾液腺におけるウイルスの増殖性において、本研究に用いた国内および外国産ヒトスジシマカで DENV1 の高い増殖性は認められたが、DENV2 の増殖性は低く、特に LBN 系統ネッタシマカではほとんど確認できなかった。ウイルスの感受性は、蚊種および系統によって差異はあるものの、本研究で用いた国内産ヒトスジシマカにウイルス感受性が示唆されたことから、国内にデング熱が侵入した場合には、小規模なアウトブレイクが起こる可能性は十分にあると考えるべきである。

2. ジェノタイプング法による媒介蚊の殺虫剤感受性の評価

2009 年にフィリピン国内 30 カ所で採集された 688 頭のネッタシマカ幼虫の *kdr* 遺伝子頻度を比較した結果、これまで中南米地域で確認されている I1011 の変異はどの個体からも検出されなかったが、V1016G の変異は 0～61% の頻度で、F1534C は 0～76.3% の頻度で確認された。G1016, C1534 とともにフィリピン全土から採集されたネッタシマカから広範囲に確認され、特に地理的な偏りは見いだせ

なかった。全土的にピレスロイド系殺虫剤による淘汰が進んだため、抵抗性個体が全国的に広がったと推察された。本結果は、先行試験で、K index (薬剤感受性レベルを 1～36 でランク分け、数字が大きいほど抵抗性レベルが高いことを示すインデックス) が多くの地域で最大の 36 を示した結果を裏付けるものとなった。

D. 考察

TaqMan プローブ法によるウイルス RNA の検出において、DENV1, DENV2, DENV3 のゲノム RNA は 0.1 コピーまで検出可能であったが、DENV4 は検出できなかった。DENV4 のスタンダード RNA に問題があった可能性が考えられた。また、免疫蛍光抗体法において、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸のいずれにもウイルス粒子は観察されたが、DENV1 は検出できなかったことから、蚊のウイルス感受性の評価系として免疫蛍光抗体法も有効ではあるが、DENV1 以外の検出も検討すべきと考える。また、今回使用したウイルス株は海外で流行している株であることから、蚊とウイルス株の様々な組み合わせを検討する必要があると考える。

ネッタシマカ LBN 系統において、DENV2 がほとんど検出されず、ヒトスジシマカ IKT 系統の唾液腺においても DENV2 の増殖は低いレベルであった。この結果は、DENV2 に低感受性の蚊種ならびに系統が存在する可能性を否定できないものの、さらに多くの系統を評価することで結論したい。また、DENV3 および DENV4 に対する蚊のウイルス感受性の評価も必要であり、デングウイルス感染蚊が、次の世代へ持ち越せるかの評価も望まれている。しかし、少なくとも DENV1 に対しては、国内の多くのヒトス

ジシマカ集団がデングウイルス感受性である可能性は高い。従って、国内にデング熱が侵入した場合には、国内に普遍的に生息するヒトスジシマカが関与する小規模なアウトブレイクが起こる可能性は十分にあると考えるべきである。

野外における媒介蚊の殺虫剤感受性を把握することは、殺虫剤の防除効果を高める上で重要である。まずフィリピン産ネッタシマカを用いて薬剤抵抗性遺伝子変異を指標としたジェノタイピング法を確立し、その手法を国内産ヒトスジシマカに応用することを目指した。これまでにベトナムのネッタシマカ 70 地域由来の 756 頭を調べた結果、G1016 の置換はわずか 1 地域から 20% の頻度として検出されていた (Kawada et al., 2009)。今回のフィリピンの結果では、調査した 30 地域中 29 カ所から G1016 の変異が検出され、その頻度も比較的高く、事態はより深刻であることが分かった。また、V1016G のみならず F1534C を有する個体の頻度も高く、近い将来フィリピン全土において両タイプの *kdr* 遺伝子頻度が 100% に限りなく近くなる可能性も否定できない。

今回得られたデータから、G1016 の頻度と C1534 の頻度の和と、抵抗性レベルを示す K index との関係調べたところ、薬剤感受性が低いほど *kdr* 頻度も低いことが示され、*kdr* 遺伝子頻度の調査が、ピレスロイド剤感受性調査の結果をある程度反映するものであると推察された。その一方で、K index が 36 を示す個体群の *kdr* 遺伝子頻度は 5.3%~116.3% と大きな開きが認められ、*kdr* 因子以外にも解毒酵素や皮膚透過性の低下などの要因が抵抗性機構として関与している可能性が示唆された。

E. 結論

- 1) TaqMan プローブ法および SYBR Green 法により、DENV1, DENV2, DENV3 のウイルス RNA の定量・評価系を確立した。
- 2) 免疫蛍光抗体法により DENV2 感染蚊の唾液腺および中腸でのウイルスの存在を確認したが、DENV1 は確認できなかった。異なる系統とウイルス株を用いて再検討する。
- 3) 供試した国内外のヒトスジシマカにおいて DENV1 の高い増殖性が認められたが、DENV2 は増殖性が低く、ネッタシマカでは増殖はほとんど確認できなかった。
- 4) 作用点ナトリウムチャンネルの変異を指標としたジェノタイピング法は、野外蚊のピレスロイド剤感受性レベルをある程度反映していることが明らかになったが、*kdr* 因子以外の抵抗性機構も関与していることも示唆された。
- 5) 今後は、作用点変異のみならず、解毒酵素等その他の抵抗性機構を加味した簡便で迅速な薬剤感受性試験法 (ジェノタイピング法) を検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

佐々木年則, 比嘉由紀子, ベンツーソ G アーリン, 伊澤晴彦, 高崎智彦, 皆川 昇, 澤邊京子, 国内外で捕集された蚊のデングウイルス感受性, 第 66 回日本衛生動物学会大会, 2014 年 3 月 22 日, 岐阜大学

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: なし

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書（H23-25 年度）

コモンマーモセットを用いた節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立

研究分担者	鈴木 隆二	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長
研究協力者	伊藤 恒敏	東北大学医学系大学院発生生物学
	松谷 隆治	和歌山県立医科大学免疫学
	鈴木 さつき	日本歯科大学生命歯学部
	藤井 克樹	国立感染症研究所ウイルス第一部
	北浦 一孝	国立感染症研究所ウイルス第一部
	白井 颯治	国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨： 近隣諸国で流行が認められているデングウイルス、チクングニアウイルスがヒトに感染すると、急性熱性疾患、出血熱、関節炎などの疾病を伴い、本邦においても地球環境の変化によりその感染拡大が懸念されている。しかしながらマウスにおいてデングウイルス、チクングニアウイルスの感染が成立しないため、ヒトで認められるような発症モデルを作成、解析することが困難であり、よりヒトに近い動物を用いた系の作成が急務である。したがって本研究では、新世界猿に属する小型の霊長類であるコモンマーモセットを用いた感染モデル系を確立し、感染時の病態を評価するための免疫学的解析における基盤整備を目的とした。

A. 研究目的

デングウイルス（DEV）は、蚊の吸血によりヒトへ感染し、発熱のみならず致死的な出血熱などの疾病を起こすことがある。本邦では過去に東南アジアから侵入した DEV が、ヒトスジシマカによって媒介され、西日本を中心に多数の感染者を発生させた経緯があるため、再興感染症として監視が必要である。またチクングニアウイルス（CHIKV）は、発熱、筋肉痛、関節痛を主症状とする急性の発疹性熱性疾患である。DEV と同様にヤブカ属の媒介によりヒトへの感染が成立し、アフリカと東南アジアで流行しており、地球温暖化に伴って感染症媒介昆虫の生息域が拡大することで、本邦侵入に伴う感染症の流行が懸念される。しかしながら、DEV、CHIKV 共にマウスにおいて感染が成立しない。したがって発症メカニズムやワクチン開発に必要な情報が不足しているため、霊長類をベースとした発症モデルの作成、病態解明等の基礎的研究は急務である。

コモンマーモセットは新世界猿に属する小型の霊長類であり、非ヒト霊長類モデルとして生理学、神経学等の研究で利用されている。他

の霊長類モデル動物と比べて小型で多産であることから、本動物において感染モデル系を確立することは有用である。そして感染時の病態を評価するために、免疫学的解析の基盤整備も平行して進めなければならない。しかし現時点において、本動物における免疫学的情報は限定されている。ウイルス感染時の病態を解明するためには、抗体産生の有無だけでなく、病理組織学的評価、経時的な炎症性サイトカインの変化、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）および T 細胞を中心とした細胞性免疫の挙動を評価することは重要である。したがって本研究では、多数の研究協力者および研究施設と連携（図 1）し、コモンマーモセットを用いた節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立を目的とした。

B. 研究方法

(1) コモンマーモセットにおける免疫解析ツールの確立（国立病院機構相模原病院臨床研究センター、和歌山県立医科大学）：感染実験によって得られたサンプルにおける免疫学的評価を実施するための基盤整備を行う。具体的に

は、Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析系、コモンマーモセット MHC 解析系、コモンマーモセット TCR レパトア解析系、個体識別系の確立から構成される。T 細胞における特異的抗原認識は、T 細胞受容体 (TCR) と病原性ウイルス由来ペプチドを提示した抗原提示細胞上の MHC 分子との相互作用により開始される (図 2 左)。マーモセットはマウスのような近交系が確立した動物とは異なるため、MHC 分子における遺伝子アレルを正確に同定することで、個体間におけるウイルス感受性の差異について考慮することが可能となる。したがって図 2 右に示すような手順により MHC および TCR の解析を進める。これら解析系の確立は、感染実験に先立って健常コモンマーモセットより採取された血液および臓器を使用する。

(2) コモンマーモセットにおける標準臓器・組織アトラスの作成 (東北大学・日本歯科大学): コモンマーモセットにおける病理学的評価を実施するためには、正常組織における基礎的情報が必要になる。したがって標準臓器・組織アトラス作成のため、感染実験に先立って健常コモンマーモセットより組織を採取し、組織標本を作製する。

(3) DEV、CHIKV 感染モデル系の確立 (国立感染症研究所): コモンマーモセットにおける DEV および CHIKV の感染実験を実施し、感染モデル系として最適な条件等を確立する。感染成立の有無については、抗体産生、体温、血液生化学的評価、炎症性サイトカインの評価等を上述した解析系を交えながら総合的に判断する。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所および各関連施設における実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

C. 研究結果

(1) Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析系: ウイルス感染に伴う炎症性サイトカインの変化を検出するため、免疫関連の細胞表面抗原および炎症性サイトカイン、それらの数値を補正するためのハウスピーキング遺伝子に対する特異的プライマーを設計した (図 3)。うち 4 つの遺伝子 (CD14、IL-1a、IL-1b、IL-12b) は本実験によって同定したものである。

(2) MHC 解析系の確立: 現在 MHC におけ

る解析は、図 4 に示すように、30 頭のコモンマーモセットを用いて *Caja-G* 遺伝子の同定が進められている。これらの解析には膨大なゲノムデータのシークエンスおよび解析が必要になるため、次世代シークエンスおよびそれに対応した専用のソフトウェアにより、コモンマーモセットにおける MHC プロタイプを決定し、最終的に感染実験に供するコモンマーモセットの選別に寄与するものとなる。

(3) TCR レパトア解析系の確立: TCR レパトア解析を確立するために、まずコモンマーモセットにおける TCR 遺伝子を同定する必要があった。これまでに TCR における α 鎖および β 鎖可変領域 (TRAV、TRBV) 遺伝子の同定が完了した。TCR β 鎖遺伝子は過去に他のグループで報告された遺伝子群とオーバーラップした TCR ファミリーも含まれたが、Adaptor-Ligation mediated PCR (AL-PCR) によって増幅された TCR 遺伝子に対して 1000 クローンに及ぶシークエンス解析を実施した結果、最終的に 35 の新規 TRAV 遺伝子、21 の新規 TRBV 遺伝子を同定した。これによりコモンマーモセットでは、各 35 種類の TRAV および TRBV 遺伝子が発現することが確認された (図 5)。現在これらの情報を基に、TCR レパトア解析系を構築するため、既にヒトおよびマウスにおいて確立された TCRV レパトア解析法を参考にしながら、コモンマーモセット TCRV 遺伝子配列に検出用 DNA プロブの選定し、microplate hybridization 法による定量的・網羅的検出系を確立した。

(3) コモンマーモセットにおける標準臓器・組織アトラスの作成: 採取された全身の臓器に対して、HE 染色および免疫学的染色手法を用いて、他の動物との差異について現在解析中である。

(4) DEV、CHIKV 感染モデル系の確立: DEV および CHIKV をコモンマーモセットに感染させるため、最適なウイルス量や投与経路についての検討を実施している。予備実験の段階で、両ウイルス共に皮下接種において、ウイルス投与コモンマーモセットから抗体が検出されたことと合わせて、CHIKV では Real-time PCR において CD3、CD8、TNF α の経時的な変化が脾臓において観察された (図 6)。

D. 考察

本研究では、コモンマーモセットを用いて非

ヒト霊長類ウイルス感染モデル系を作成することにある。さらに感染モデル系を評価するための免疫学的解析系についても開発を進めている。これまでの研究により、免疫関連遺伝子に対する Real-time PCR 系の確立により、感染動物における抗体産生の有無以外に、T 細胞の挙動および炎症性サイトカインの増加についても解析が可能になった。CHIKV 感染コモンマーモセットにおける CD3、CD8、TNF α の経時的な変化は、これまでマウスでは不可能であったウイルス感染が、コモンマーモセットにおいて成立したことを示唆するものである。MHC および TCR レパトア解析系は開発中であるため、感染サンプルに対して評価を行える段階にないが、今後は投与量および頭数を揃えることで、感染が成立する個体における MHC ハプロタイプの解析、また局所における炎症部位で浸潤する T 細胞の抗原特異性を探るために TCR レパトア解析が役立つものと思われる。炎症像やリンパ球浸潤を特定するためにも、正常組織との比較による病理学的解析、免疫組織学的が必要になる。

E. 結論

本研究により、マウスでは感染が成立しないウイルスに対して、非ヒト霊長類感染モデル動物としてコモンマーモセットに注目した結果、Real-time PCR 系によって感染の成立が確認された。今後コモンマーモセットにおける免疫学的解析ツールを充実させることで、感染時の病態に対する情報が得られるものと思われる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fuji Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki RS, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R.: Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes.

Plos One. 2013 Oct 3;8(10):e76385.

Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K,

Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Kurane I, Suzuki R.: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay.

J Immunol Methods. 2012 Oct 31;352(29):287-300.

Kurane I, Matsutani T, Suzuki R, Takasaki T, Kalayanaraj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA.: T-cell responses to dengue virus in humans.

Trop Med Health. 2012 Oct 31;384(1-2):81-91.

Matsutani T, Fujii Y, Kitaura K, Suzuki S, Tsuruta Y, Takasaki T, Ogasawara K, Nishimoto N, Kurane I, Suzuki R.: Increased positive selection pressure within the complementarity determining regions of the T-cell receptor β gene in New World monkeys.

Am J Primatol. 2011 Oct;73(10):1082-92.

Fujii Y, Matsutani T, Kitaura K, Suzuki S, Itoh T, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I.: Comprehensive analysis and characterization of the TCR alpha chain sequences in the common marmoset.

Immunogenetics. 2010 Jun;62(6):383-95.

2. 学会発表

北浦一孝、松谷隆治、藤井克樹、白井頌治、鈴木さつき、高崎智彦、小笠原康悦、西本憲弘、倉根一郎、鈴木隆二：新世界ザルにおける T 細胞受容体 β 鎖遺伝子の CDR3 領域における正の選択

第 40 回日本免疫学会学術集会（東京）2011 年 11 月 27-29 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし。

2：実用新案登録

なし。

3：その他

なし。

コモンマーモセットを用いた
節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立
組織図

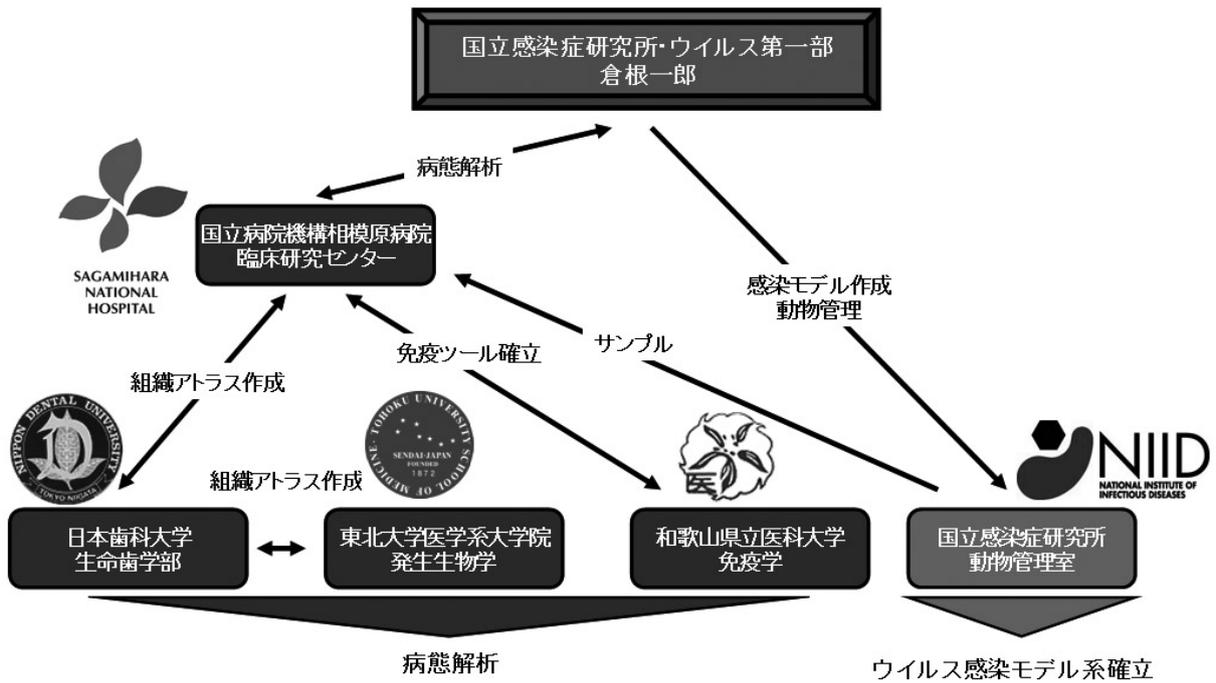


図 1. 本研究における組織図

Antigen recognition by TCR

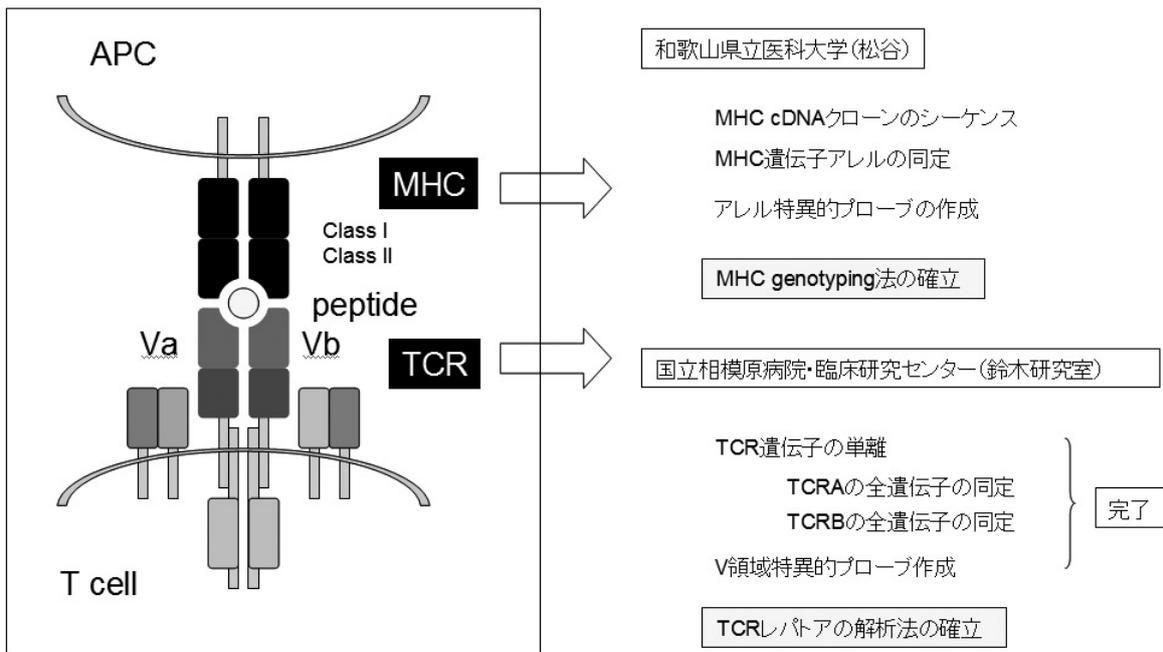


図 2. TCR における抗原認識機構およびマーモセットにおける TCR、MHC 解析手順

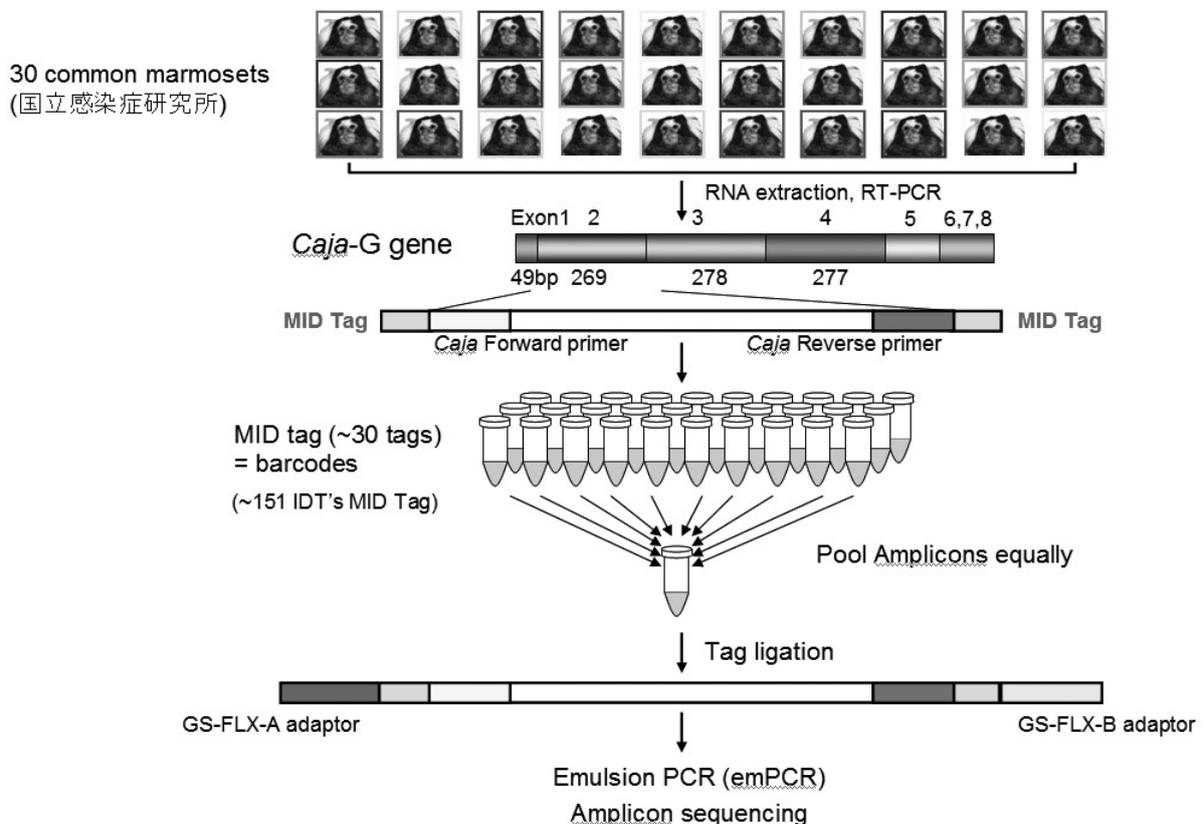
既にプライマーを設計し測定可能な遺伝子

Target	GenBank	備考	Target	GenBank	備考
GAPDH	DD279474		IL-1a	AB539803	新規登録
β -actin	DD279463		IL-1b	AB539804	新規登録
HPRT	DD289567		IL-2	DQ826674	
CD3e	DQ189218		IL-4	EF493341	
CD4	AF452616		IL-5	DQ658152	
CD8a	DQ189217		IL-6	DQ658153	
CD14	AB539802	新規登録	IL-10	DQ658154	
CD20	DQ189220		IL-12b	AB539805	新規登録
CD25	DQ520834		IL-17a	EF534212	
CD28	EF534209		IL-17f	EF613223	
CD34	AB097501		INF- γ	FJ598593	
CD80	EF534214		TNF- α	DQ520835	
CD86	EF534211				

* 新規登録:我々が塩基配列を特定してGenBankへ登録したもの

図 3. コモンマーモセット免疫関連遺伝子における検出可能遺伝子の一覧

Pyrosequencing with Roche Genome Sequencer FLX System



MHC genotyping using massively parallel pyrosequencing

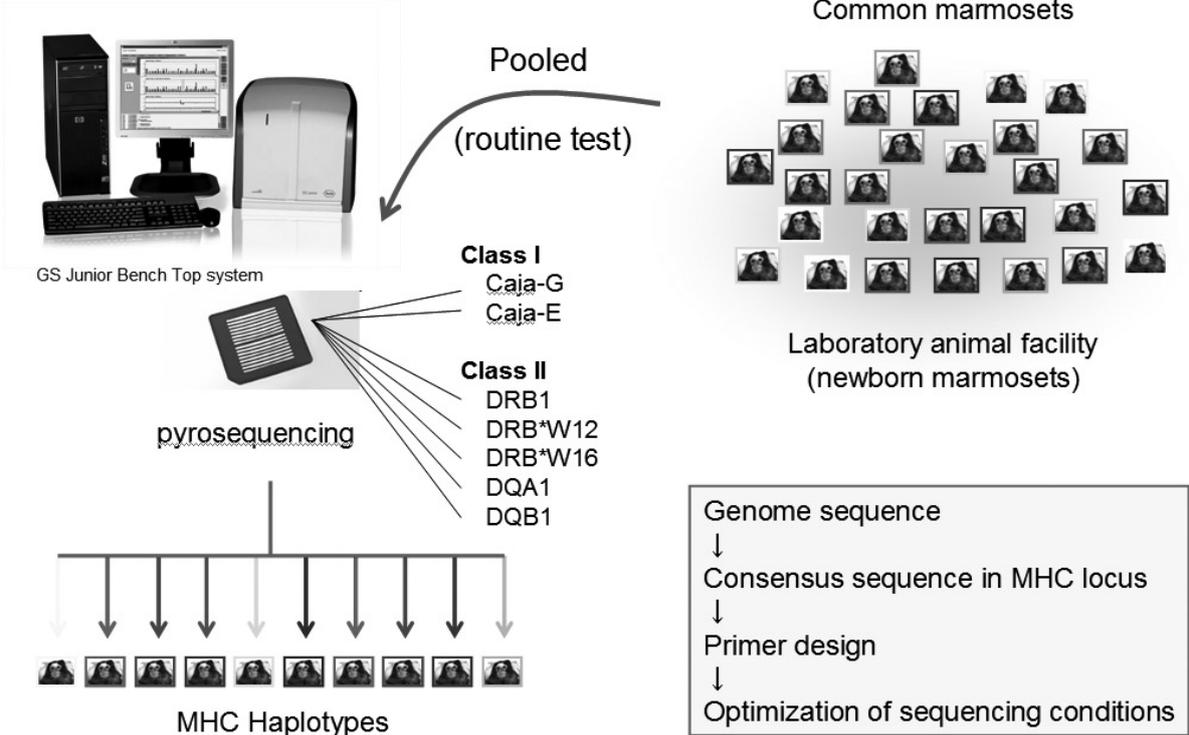


図 4. 次世代シーケンサーを用いた *Caja-G* 遺伝子ハプロタイプの決定

Accession Number	gene name	FR 1 (1-26)		CDR 1 (27-38)		FR 2 (39-55)		CDR 2 (56-65)		FR 3 (66-104)				CDR 3 (105-)	Nucleotide homology	Amino acid homology	
		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100					
AB504390	CJTRAV1-2	GGNIGQ	PTEVTAMEGAI	VQINCTYO	TTG.....FNG	LSWYQQRDGKAP	FLSY NVL.....NG	LEE.RG.....	HFSSFLNRSKGY	SYLLVKKLQMK	SDASYLC	AVR.	90.9	83.5			
AB504391	CJTRAV2	RQDVSQ	PSTVASSEGAV	IFCNHS	VSN.....AYN	FFWYLFHPGHE	PRLLVK GS.....R	PSQ.OG.....	RYNMTYER..	FSSLLILQVQ	EADAAVYVC	A...	95.7	92.9			
AB504392	CJTRAV4	LAKTTQ	PIEMDSYEGE	VNI SCSDH	NIAT.....SDY	IFWYQGFNPG	PRLI IQ GY.....KT	NVA.NE.....	VASLFI PAER	KSSLSLPRVAL	SDTAVYVC	VVG.	91.6	87.9			
AB504393	CJTRAV5	GDQMKQS	LF.LSVREGDS	VVINCTY	DSS.....SSY	LWYKQPGASL	QLLAL ILS.....NTD	TQK.DO.....	RLTVQLDKN	KHLSLQIAET	TGSDAIYSC	AER.	89.1	80.4			
AB504394	CJTRAV8-1	AQSVSPD	HVITVSEGAS	LELRCNYS	YGG.....TVT	LWYKQDPGDL	QLLLK YYSG...DTL	VKG.IK.....	GFEAEFMK	RSQSFNLRK	PSVOWSDAEYFC	AVK.	91.9	85.1			
AB504395	CJTRAV8-3	AQSVTPD	HVITVSEGAS	LELRCNYS	YGA.....TAY	LWYKQDPGDL	QLLLK YFSG...DTL	VQG.IK.....	GFEAEFKS	QSFNLRK	PSVOWSDAEYFC	A...	96.4	97.8			
AB504396	CJTRAV8-6s1	AQSVTQD	GGVTVSEAP	VLLKCNYS	SSV.....TVY	PFWYQSPN	QGLQLLLK YLSG...PTL	VKG.VK.....	GFEAEIKK	SESSFNLRK	PSVOWSDAEYFC	AV.	90.0	78.5			
AB504397	CJTRAV8-6s2	AQSVTQD	GGVTVSEAP	VLLKCNYS	SSVS.....VYV	LFWYQSPN	QGLQLLLK YLSG...PTL	VKG.IK.....	GFEAEFKS	SESSFNLRK	PSVOWSDAEYFC	AV.	88.0	78.7			
AB504398	CJTRAV9-1	GNSVVTG	TEGELLSE	GDSTLVNCSYE	STG.....YPS	LFWYQYPGK	GPELLLK AMK...GND	KGRSNK.....	DFEAIYR	TETTSFHLEK	GSVQESDAVYFC	AL.	91.8	83.9			
AB504399	CJTRAV10	KNQVEQ	SPQLVILEG	KNCTLCQNYT	VTP.....FNN	LWYKQDPG	KPILTLMI MTF...SEN	TKS.NG.....	RYAATL	DANTKQSS	LHITASQLSDS	ASYIC	93.7	88.9			
AB504400	CJTRAV12-1	KQVEQD	PGPFNVPE	GTTFVFNCTYS	NSA.....SQS	FFWYKQDP	PKGPKLLMS VYS...SG	N.E.DG.....	RFTAQL	NRASRYVSLI	IRDSQLSDS	ATYLC	AV.	94.1	91.1		
AB504401	CJTRAV12-2	QKLEQNS	GPLNVPEGA	IASLNCCTYS	DRG.....SQS	FFWYKQD	SGKPELLMS IYS...NG	DEE.DG.....	RFTAQL	NRASQVSLFI	RDSQLSDS	ATYLC	AV.	90.9	86.8		
AB504402	CJTRAV12-3	KQVEQD	PGPFNVPEGA	IASLNCCTYS	NRA.....FDY	FWYKQD	SRKPELLMF TYS...SD	KKE.DG.....	RFTAQL	NKSSQYISLFI	RDSQPSD	ATYLC	AVS.	92.8	87.0		
AB504403	CJTRAV13-1	GENVEQ	RPSTLSVQ	GDSSVINCTYS	DSA.....SNY	FWYKQD	LGKGPLIID IRS...NVD	KRK.DR.....	RMTVLL	NKTAKH	SLHITDTPG	SDATYFC	AAG.	90.4	82.8		
AB504404	CJTRAV16	AORVTP	PEKTLV	SFVGFAPVQLKCNYS	YSG.....NPD	LFWYKQD	SSRGLQLLLK HI...S	RES.VK.....	GFTADL	NKGETSF	HLKPKP	QAEDSATYFC	AL.	91.4	86.5		
AB504405	CJTRAV17	SQGEFEP	PTLSIQEGE	NMNCYSYK	TSI.....SS	LWYKQD	SSRGLTQVL IRS...NER	EKY.SG.....	RLRFT	LDSMKSS	SLFIAAQA	ADTAAYFC	AL.	91.2	81.3		
AB504406	CJTRAV18	GDVSTQ	TEGPTLLE	GAALTLNCTYO	SSY.....SAF	LFWYKQD	NKPELLK SSE...NO	ETD.SR.....	GQASHV	KSDSSFHLEK	SSVQLSDS	AVYFC	ALR.	94.6	92.4		
AB504407	CJTRAV19	AQKVI	QAQTEI	VYVKE	DVTLDCLYK	TSDT.....TYY	LWYKQD	PREMIFLIR QNSF...NEO	NEI.NG.....	RYSNWF	FORSTSSFN	LITASQV	IDS	AVYFC	ALSE	91.7	83.3
AB504408	CJTRAV20	EDVOTR	HEALRLQEG	DSSINCSY	VSS.....FNR	LLWYKQD	PKGLEFLI LYS...AGE	EKO.KG.....	RLKATL	TK.KESFLH	IATPKP	EDSATYLC	A...	92.5	85.4		
AB504409	CJTRAV21	KQEVTO	QIPALN	VPEDSLVNLCSFT	DRA.....TNR	LWYKQD	PKGLTSLLL IGS...SQR	EQT.SG.....	RLTALL	DKSSG	STLYIAASQ	PGDSATYLC	AV.	94.6	94.4		
AB504410	CJTRAV22	GIQVEQ	SPDOLLQEG	AMTYLRCNFS	TSV.....NN	WYKQD	PKGLINFLV IR...SQ	TQK.NG.....	RLSATT	VMEYRSLH	ISSHTT	DAIYFC	AV.	93.7	87.8		
AB504411	CJTRAV23	QQVQSP	QSLIVQKGE	ISVMNCTYS	NSA.....FDY	FWYKQD	PKSPALLIA IHS...VMI	VKE.EG.....	RFKIF	FNKSAKH	SLHIMASQ	PGDSAIYFC	AA.	91.0	79.3		
AB504412	CJTRAV24	ILYVQSP	QSLRVQEG	DSTNFCSP	SSN.....FYA	LWYKQD	PKPENLLV MTL...NGD	EKK.KG.....	RIINVT	LNTKEG	SYLYIKASQ	PGDSATYLC	A1.	95.7	93.4		
AB504423	CJTRAV25	GGQIQI	PHFQHVQED	EDFTIYCNSS	TTL.....DN	LWYKQD	PGHPVFLIR LVK...SGE	VMK.QK.....	RLTFQ	GEARK	NSSLHITATQ	TDDVGYFC	AG.	92.7	89.0		
AB504413	CJTRAV26-1	DAKTTQ	PTSDCAE	GRAANLPCNHS	TISG.....NEY	IHWYRQ	IHSQPOYI IH GL...KN	NET.NE.....	MASL	IAEDR	KSSLHITATQ	TDDVGYFC	IVRV	94.9	92.4		
AB504414	CJTRAV26-2	DAKTTQ	PNSMES	NEEPPVHLPCNHS	TISG.....ADY	IHWYRQ	LSAGPEYI IH GT...TS	NVN.NR.....	MASL	IAEDR	KSSLHITATQ	TDDVGYFC	IL.	94.1	93.3		
AB504415	CJTRAV27	TQLEQSP	QPLSIQEGE	GFVYCNSS	SVF.....TN	LWYKQD	PGEPVLLGT LVK...SGE	VKK.QK.....	RLIFQ	GDARK	SSLHITAAQ	PBGTGLYFC	AA.	93.0	85.6		
AB504416	CJTRAV29	DQVQKNT	PLSVQEGE	SLINCDY	NNL.....FDY	FWYKQD	PAEPAI LIS IRS...VTN	QNK.DG.....	RFTV	FLNKS	ANLHIIAASQ	PGDSAVYFC	AA.	91.4	80.4		
AB504417	CJTRAV34	SQLEQSP	QSLIQEGE	NLINCSS	KTL.....YA	LWYKQD	YEGELIFLMM LQI...GGE	EKS.HE.....	KITAKL	DEKQ	SSLHITASQ	PSHTGYFC	GA.	93.8	92.3		
AB504418	CJTRAV36	EDKVI	IGSPSLV	HEEDSVTVNCSYE	AAN.....FQS	LLWYKQD	KKALTLFLM LTS...SRI	EKK.SG.....	SLSSML	DKKRF	SLHITATK	TRDSATYFC	AV.	90.5	81.3		
AB504419	CJTRAV37	QLPVEQ	PPSLKVKGE	DSTVTVNCSYR	DSA.....SDF	FWYKQD	PEEGLISL IQL MLS...NVR	EKI.SG.....	RFTAR	EKKD	QFSLHIED	SQLHDS	TFYFC	AA.	95.6	90.2	
AB504420	CJTRAV38-1	AQRVQSE	SEMVSQEA	ETVTLNCTYO	SSDS.....DYY	FWYKQD	SPRQMLVLR QEAY...KQO	NAT.EN.....	RFSVNF	QKA	AKSFLKISGS	QLGDTAMVFC	AYRS	95.1	91.7		
AB504421	CJTRAV38-2	SOVVAQ	SPMVSQEA	ETVTLNCTYO	TSDS.....NYY	FWYKQD	SPRQMLVLR QEAY...KQO	NAT.EN.....	RFSVNF	QKA	AKSFLKISGS	QLGDTAMVFC	AYRS	93.4	86.5		
AB504422	CJTRAV39	ELKVGQ	SPFLSTQEG	KNCTIYCNYS	ATV.....SNR	LHWYKQD	PKSLKFLV LLS...NGA	AIQ.EG.....	QLTASL	DTKARL	SLHITAPV	HGLSATYFC	AVD.	90.3	82.6		
AB504424	CJTRAV41	KNEVQ	SPQDLTVQEG	FVTINCYSY	IGI.....TT	LWYKQD	PGGIVSLFV LK...SE	NKK.HG.....	RLTAT	INLQEK	HSSLHITASQ	PRDSAIYFC	A...	92.4	83.9		
Average															92.6	86.8	

Accession Number	gene name	FR 1 (1-26)			CDR 1 (27-38)			FR 2 (39-55)			CDR 2 (56-65)			FR 3 (66-104)				Nucleotide identity	Amino acid identity
		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100							
AB504471	CJTRBV2 (*)	EPEVTQTPSHQVTVMGQEVILWCVP	LN	FFYYRQ	ILGKQVEFLVY	FYN	DN	SEKSEI	FDDRFVSKRP	DGSNFTLKI	QSTKLEDSATYFC	AS	92.3	86.2					
AB504472	CJTRBV3-2 (*)	DSAVSQTPKYLVTQMGKESLKCEGN	LGH	DA	MYWYKQDSKLLKIMFI	YNN	KER	ILNETVP	NRFSPESP	DKAHLNLHI	ESLELGDSDALYFC	ASSQ	93.5	89.2					
AB504473	CJTRBV4-1s1 (*)	DTGVTQTPKHLVMGMTDEKSLQCEGH	LGH	NA	MYWYKQKAKKPPPELMFI	YNY	EEI	SVNESVP	SRFSPCEP	DSSHLYLHLHALQPEDSALYLC	ASSQ	91.6	85.3						
AB504474	CJTRBV4-1s2	DTGVTQTPKHLVMGMTDEKSLQCEGH	LGH	NV	MYWYKQKAKKPPPELMFI	YNY	EEI	SVNESVP	SRFSPCEP	DSSHLYLHLHALQPEDSALYLC	ASSQ	91.3	83.2						
AB504475	CJTRBV4-1s3	DTGVTQTPKHLVMGMTDEKSLQCEGH	LGH	NV	MYWYKQKAKKPPPELMFI	YNY	KEI	SVNESVP	SRFSPCEP	DSSHLYLHLHALQPEDSALYLC	ASSQ	90.2	82.1						
AB504476	CJTRBV4-2	DTGVTQTPKHLVMGMTNKKSLQCEGH	LGH	NA	MYWYKQKAKKPPPELMFI	YIL	QER	TENNSVP	SRFSPCEP	DSSHLYLHLHALQPEDSALYLC	ASSQ	89.8	86.3						
AB504477	CJTRBV5-1s1	EAGVTQTPRHLIKMRGGQVTLRCSP	SGH	SS	VYWYQAPGGGQPLFO	YNN	EIQ	NEKGNFP	ARFSGROF	SNYSSEMNVALELGDSDALYLC	ASSL	90.5	80.0						
AB504478	CJTRBV5-1s2 (*)	EAEVTQTPRHLIKMRGGQVTLRCSP	SGH	NS	VYWYQAPGGGQPLFO	YNN	AIE	RQKGNFP	DRFSGHOF	SNYSSEMNVALELGDSDALYLC	ASSL	89.8	77.9						
AB504479	CJTRBV5-3	QAKVTQTPRHLIKMRGGQVTLRCSP	SGH	TS	VSWYQAPGGGQPLFO	YNN	EFK	RSEGNFP	GRFSGYOF	SDYHSENNI	STLELGDSDALYLC	ASS	89.4	83.0					
AB504480	CJTRBV6-5s1 (*)	NAGVTQTPKQVLRKGGSTTMECSQD	MNH	DR	MYWYQDPGGLRLIHY	SVG	EGT	TDKGEVH	DGYNVSR	NTDKFPLRLIEAASQTSVYFC	ASSD	90.6	80.0						
AB504481	CJTRBV6-5s2	TAGVTQTPKQVLRKGGSTTMECSQD	MNH	YY	MYWYQDPGGLRLIHY	SVG	KGT	TDKGEVH	DGYNVSR	NREDFLLRLEAASQTSVYFC	ASS	91.9	85.1						
AB504482	CJTRBV7-2s1	GAGVSDSPSNKVIKTKGNDVALRCDFP	SGH	NA	LYWYRGLGKGLLEFLIY	FQG	NDA	PKSGPLSDRFSAERS	GRSSTLKI	QRTEQDQSAVYLC	ASSL	91.7	86.5						
AB504483	CJTRBV7-2s2	DAGVSDSPSNKVIKTKGNDVALRCDFP	SGH	TA	LYWYRGLGKGLLEFLIY	FQG	KDI	PKSGPLSDRFSAERS	GRSSTLKI	QRTEQDQSAVYLC	ASSL	89.6	83.3						
AB504484	CJTRBV7-6 (*)	GAGVSDSPRYKVTIKRGGDIAFSCDFP	SGH	ET	LYWYRGLGKGLLEFLIY	FQN	EAQ	LKSGPLSDRFSAERS	GRSSTLKI	QRTEQDQSAVYLC	ASS	91.2	81.1						
AB504485	CJTRBV7-9	GAGVSDSPRYKVTIKRGGDIAFSCDFP	SGH	TR	LYWYRGLGKGLLEFLIY	FQN	EAQ	LKSGPLSDRFSAERS	GRSSTLKI	KRTVGGDSAMVYLC	ASS	89.9	78.9						
AB504486	CJTRBV9	DSGVTQTPKHLIATIGORVALRCDFP	SGD	LS	VYWYRGLDQSLQFLIY	YNN	GNE	REKGNIP	EGFSGGOF	PNMSSLELNSSLELGDSDALYFC	ASS	92.2	86.2						
AB504487	CJTRBV10-1	DAEIQTPRHLIKETGROVTLKCHGS	WNH	DY	MYWYRDLGGGLRLIHY	SVA	VED	TKKGEVH	DGYNVSR	DPEDFPLTLESATHSQTSAVYFC	ASSD	90.9	83.2						
AB504488	CJTRBV10-2	DAEIQTPRHLIKETGROVTLKCHGS	WNH	NY	MYWYRDLGGGLRLIHY	SVA	ADD	TKKGEVH	DGYNVSR	NLEDFPLTLESATHSQTSAVYFC	ASS	89.7	81.7						
AB504489	CJTRBV11-1 (*)	EAGVQVPRYKIKTEKQAVAFWCDPV	SGH	AG	LYWYRQILGGPELLIY	FLN	EEV	VDSQPKDRFSAERL	EGVNSTLKI	QPAELGDSDALYLC	ASS	92.7	87.4						
AB504490	CJTRBV11-2	ETGVTQTPRYKIKTEKQAVAFWCDPV	SGH	AG	LYWYRQILGGPELLIY	YQN	KDV	VDSQPKDRFSAERL	EGVNSTLKI	QPAELGDSDALYLC	ASS	93.0	86.3						
AB504491	CJTRBV12-3 (*)	DAEVIQSPQHEVTENGQVTLRCDFP	SGH	TO	LFYWRQIMMRGLLEFLIY	FNN	EDL	IDSGMPKDRFSAERP	NASFSTLKI	QPSEPGDSAVYFC	ASSL	92.4	87.5						
AB504492	CJTRBV12-5	DARVTQTPRHLIKETGROVTLRCDFP	SGH	NT	VFYWRQIMMRGLLEFLIY	LRN	RAL	LDSGMPKDRFSAERP	TASLSTLKI	QPSEPGDSAVYFC	ASSL	92.4	87.5						
AB504493	CJTRBV13	AAGVIQYPRYKIKETGROVTLRCDFP	SGH	DT	VYWYRQIMMRGLLEFLIY	YQE	KMQ	RDKGIIP	DRIAAROF	SDYHSELNSSLELGDSDALYLC	ASS	94.0	88.3						
AB504494	CJTRBV14 (*)	AAGVIQYPRYKIKETGROVTLRCDFP	SGH	ES	LFYWRQIMMRGLLEFLIY	FLR	DSK	QDESMPKDRFSAERP	GGTSTLKI	VKSLELGDSDALYFC	ASS	90.2	78.9						
AB504495	CJTRBV15 (*)	DAMVIQNPFRYQLTQKPVTLRCDFP	LNH	DA	MYWYRQIMMRGLLEFLIY	YQD	KDL	NNEADTP	DNFQARRP	NTSFDFLDI	HSSVLDGSAATYLC	ASSR	90.9	82.1					
AB504496	CJTRBV18	NAGVTQTPRHLIKETGROVTLRCDFP	SGH	SH	VYWYRQIMMRGLLEFLIY	LQK	ESI	IDSGMPKDRFSAERP	KEGFSVLR	IQAEERDQSAVYFC	ASS	90.5	86.3						
AB504497	CJTRBV19	DGGITQSPRHLIKETGROVTLRCDFP	LNH	DA	MYWYRQIMMRGLLEFLIY	SQI	VDA	FQKQGIT	EGYSVQOE	KKEGFSVLR	TVSAGGNTAFYLC	ASS	92.6	91.5					
AB504498	CJTRBV20-1 (*)	GAVVSDSPRYKIKETGROVTLRCDFP	SGH	ATT	MFYWRQIMMRGLLEFLIY	SNEG	SKA	TYEQGFSDFNFI	SHP	NLTFSSLTVA	SAHPEDSDALYFC	SGR	90.0	79.4					
AB504499	CJTRBV21-1 (*)	DTKVTQTPRYKIKETGROVTLRCDFP	KGH	SY	VYWYRQIMMRGLLEFLIY	LQN	GEI	IQKSEVINERFLAACP	ENSPCALEI	ILVSDPGRDRLALYLC	ASSQ	90.7	80.6						
AB504500	CJTRBV23-1 (*)	HAKVTQTPRYKIKETGROVTLRCDFP	KGH	TF	VYWYRQIMMRGLLEFLIY	FQN	EQI	LEETEIHKRFLSOCP	RNSPCALEI	ILVSDPGRDRLALYLC	ASSQ	92.4	83.3						
AB504501	CJTRBV24-1 (*)	HAKVTQTPRYKIKETGROVTLRCDFP	KGH	NO	VYWYRQIMMRGLLEFLIY	SLG	VQD	INKEGIS	HGYSVSRQ	EOPKFSLS	LESATSNHTALYFC	ATS	91.5	80.9					
AB504503	CJTRBV27	EAGVTQTPRHLIKETGROVTLRCDFP	MNH	DY	MSWYRQIMMRGLLEFLIY	SNN	VDL	VDKGQVP	EGYSVSRK	EKRNFPL	IVESPHQTSALYLC	ASS	92.6	88.3					
AB504504	CJTRBV28 (*)	EAVKVTQTPRYKIKETGROVTLRCDFP	MDH	GR	MFYWRQIMMRGLLEFLIY	SYD	IKN	YKGDVDP	DGYNVSRK	KKEGFSLS	ILGSASTSQTSAVYLC	ASS	91.2	81.9					
AB504505	CJTRBV29-1	GAVVSDSPRYKIKETGROVTLRCDFP	SGV	TL	MFYWRQIMMRGLLEFLIY	ANGG	SEA	TYEKGAFKDFPI	SRP	NLTFSTLNV	SMSPEDSGIFVFC	SAG	89.9	81.3					
AB504506	CJTRBV30	SQTIHQWPAFLVQPVGSLLSLECTYK	GTS	NPN	LYWYRQIMMRGLLEFLIY	SVS	VD	QIHSEVP	QNLASRP	QDEQFILLSSKLL	LSDSGFYLC	AW	93.6	90.4					
														Average	91.3	84.0			

*: Genes reported in the previous study

図 5. コモンマーマセットにおける TRAV および TRBV 遺伝子の一覧

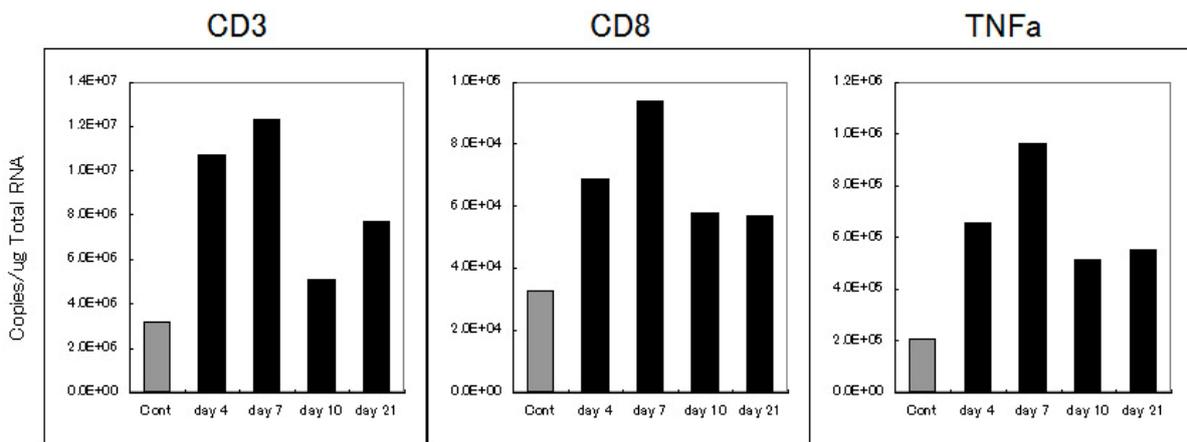


図 6. CHIKV 感染コモンマーマセット脾臓におけるリアルタイム PCR 解析結果 (Cont はコントロール、day は感染日数を示す)

小括

コモンマーモセットのTCRレパトアは、

- ・個体間で類似する
→ヒトのTCRレパトアの傾向と類似
- ・リンパ組織間で類似する
→組織特異性は低い
- ・胸腺分画間で類似する
→マウスで認められるような
DP、SP間の相違(MMTV感作による
特定のβ鎖のデリージョン)は無い

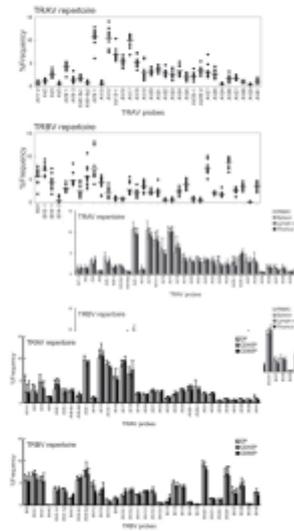


図 7. コモンマーモセットの TCR レパトア解析系

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究総合報告書（H23-25 年度）

デングウイルス感染症の診断および予防対策に関する研究

研究分担者 モイメンリン（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究協力者 高崎智彦、林昌宏、小滝徹、田島茂、倉根一郎（国立感染症研究所）

網康至、須崎百合子（国立感染症研究所動物管理室）

鈴木隆二、白井顕治、北浦一孝（国立病院機構相模原病院）

大松勉（東京農工大学農学附属国際家畜感染症防疫研究教育センター）

研究要旨

デングウイルスは、蚊によって媒介されるウイルスであり、世界的に大規模な流行を引き起こしている。年間約 4 億人がデング熱を発症し、そのうち約 2 万人が死亡する。我が国におけるデング熱の輸入症例は増加傾向にあり、年間数百症例が報告されている。しかし、デングウイルス感染症に対するワクチンおよび治療がいまだに実用化されていない。デングウイルス感染症の予防対策の一環として、診断法の評価と改良、新規診断法の開発、ワクチン・治療開発のためのモデル動物の確立が必要である。本研究班では、デングウイルスの実験室診断法を確立と評価を実施した。さらに、発症および防御に係る機構を明らかにするため、動物モデルを確立し、ワクチン・治療開発に必要な基盤研究が進展した。診断法の開発では、新規ウイルス分離法および複数の血清型ウイルスによる重複感染症の新規病原体診断を確立し、その有用性を証明した。デングウイルス感染症の動物モデル開発では、霊長類（マーモセット）デングウイルス感染症モデルを確立し、ウイルス学および血清学的の検討を行った。以上のモデル動物実験結果により、本モデル動物は、デング熱のワクチン・治療開発に有用であることを証明した。

A. 研究目的

世界人口の 3 分の 1 がデング熱流行地域（熱帯・亜熱帯）で生活しており、年間約 4 億人がデング熱・出血熱を発症する。我が国におけるデング熱患者数は年々増加傾向にあり、2013 年は 1999 年以来、もっとも高い患者数（249 人）が報告された。世界的に患者

数が多いにもかかわらず、デング熱に対するワクチン・治療がいまだに実用化されていない。このように、デング熱に対する対策に関しては、診断およびワクチン・治療開発が必要である。本研究班では、デングウイルス感染の診断体制の確立・整備の一環として、新規病原体診断法（ウイルス分離、重複感染に

におけるウイルス分離、抗原検査)の開発および有用性検討をし、患者発生に備えている。さらに、ワクチン・治療開発のためには、モデル動物の構築や発症機序をウイルス学的や免疫学的に解明することが必要である。

B. 研究方法

1. 診断法の開発・改良

1) 新規病原体診断法(抗体依存性感染増強現象を応用したウイルス分離法)の開発・有用性評価:

感染増強活性を有する抗体を用いて、FcγR 発現細胞にて Dengue ウイルス分離法を確立した。開発したアッセイ法を従来のウイルス分離法(C6/36 および FcγR 非発現 BHK 細胞)にて比較検討した。さらに、Dengue 熱患者から採取した血清を用いて、本アッセイの有用性を検討した。

2) 新規病原体診断法(複数の Dengue ウイルス血清型による重複感染症の確定診断法)の開発・有用性評価:

中和活性および感染増強活性を有する抗体(回復期血清)を用いて、FcγR 発現細胞にて新規 Dengue ウイルス分離法を確立した。開発したアッセイ法を従来のウイルス分離法(FcγR 非発現 Vero および BHK 細胞)にて比較検討を行なった。さらに、Dengue ウイルス重複感染症患者からの血清を用いて、本アッセイの有用性を検討した。ウイルス価は、RT-PCR およびプラーク法にて測定した。

3) 尿検体を用いた NS1 抗原迅速診断法により Dengue ウイルス病原体診断:

Dengue ウイルス NS1 抗原迅速検査キット、ELISA キットを用いて、尿検体における NS1

抗原の検出率を他の検査法(IgM/IgG 抗体および RT-PCR)と比較検討した。

2. Dengue ウイルス感染症のモデル動物の開発

1) マーモセットを用いた Dengue ウイルス感染症モデル動物の開発:

DENV2 をマーモセットに接種し、ウイルス価の定量、抗体上昇、生化学的および血液的变化を検討した。

C. 研究結果

1. 診断法の開発・改良

1) 新規病原体診断法(抗体依存性感染増強現象を応用したウイルス分離法)の開発・有用性評価:

本研究ではこれまでに確立した Dengue ウイルス血清学的検査法(抗体依存性感染増強(antibody-dependent assay, ADE)アッセイ法)がウイルス分離に使用可能であることを、Dengue 熱患者血清を用いて検討した。抗体依存性感染増強活性を有する抗体(mAb4G2)の存在下で、FcγR 発現 BHK 細胞を用いて患者血清からウイルス分離を試みた。患者血清からウイルス分離を試みたところ、感染増強抗体存在下の FcγR 発現 BHK 細胞上清のウイルス価は、他の細胞(非 FcγR 発現 BHK 細胞、C6/36 細胞)より高価であった。さらに、50 検体中 16 検体においては、非 FcγR 発現細胞よりウイルスが分離できなかった。その 16 検体中 7 検体(44%)は ADE アッセイにて分離することが可能であった。以上の結果より、感染増強抗体の存在下での FcγR 発現 BHK 細胞(ADE アッセイ)は、従来のウイルス分離法と比較し高率に Dengue ウイルスの分離が可能であり、Dengue ウイルス分離検査に有用なツ

ールである。

2) 新規病原体診断法（複数のデングウイルス血清型による重複感染症の確定診断法）の開発・有用性評価：

我々はこれまでに確立した FcγR 発現 BHK 細胞を用いた新規中和試験法がデングウイルス重複感染に使用可能であることを、重複デングウイルス感染の患者血清からデングウイルスの分離を試みた。我々は、中和および感染増強活性を有する回復期患者血清 (NtAb) を用いて新規中和アッセイにより、それぞれのデングウイルスの分離に成功した。以上の結果により、この FcγR 発現 BHK 細胞を用いた新規病原体診断法により、デングウイルス血清型重複感染は、感染性のある二つの血清型ウイルスによる感染であることをはじめ明確に証明した。

3) 尿検体を用いた NS1 抗原迅速診断法によりデングウイルス病原体診断：

我々は、NS1 抗原 ELISA 法および簡易イムノクロマト法が尿検体を用いた場合にも NS1 抗原が検出であるかを検討した。さらに、血中の NS1 抗原検出率を尿検体の抗原検出率と比較検討を行った。ELISA 法では、血中の NS1 抗原が高感度で検出された。一方、尿中の NS1 抗原検出率は、血清検体を用いた場合よりやや低い。尿中の NS1 抗原は、いずれ検査法 (ELISA 法およびイムノクロマト法) においてもほぼ同じ検出率で検出された。

2. デングウイルス感染症のモデル動物の開発

1) マーモセットを用いたデングウイルス感染症モデル動物の開発：

感染モデルの評価については、ウイルス接種後、経時的にウイルス血症定量、中和抗体測定、体温、活動性、肝機能・腎臓機能検査を行った。本検討により、全ての個体において、ウイルス血症が認められた。感染ウイルス血清型に対する中和抗体上昇は全個体に認められたが、異なる血清型に対する中和抗体価は低い、または検出されなかった。12 個体中、5 個体 (5/12) においては、ウイルス接種後に血小板減少症が認められ、9 個体においては白血球減少症を呈した。7 個体は、発熱および活動低下を呈した。さらに、ウイルス接種を行っていない対象のマーモセット 4 個体においては、これらの症状を示さなかった。デング熱モデル動物であるマーモセットは、デングウイルス接種後においてはデング熱の典型的な症状 (発熱、活動低下) と生化学的変化を呈した。

D. 考察

本研究班では、節足媒介性ウイルスの感染症予防対策の一環として、新規診断法の確立、既存の診断法の手順改良・評価し、病原体診断法 (ウイルス分離および抗原検出法) を整備するとともに、ワクチン・治療開発に必要なモデル動物の開発・評価に関する研究を実施した。

我々は、(1) 新規病原体診断法 (抗体依存性感染増強現象を応用したウイルス分離法) の開発・有用性評価を行い、開発した新規ウイルス分離法 (ADE アッセイ) は、従来のウイルス分離法と比較した。開発した新規 ADE アッセイにより、高率にデングウイルスの分離が可能となり、ウイルス分離検査に有用なツールであることが示唆された。さらに、我々

は、(2)複数のデングウイルス血清型による重複感染症の確定診断法を開発し、その有用性を証明した。本研究法では、中和および感染増強活性を有する回復期患者血清を用いて新規中和アッセイにより、それぞれのデングウイルスの分離に成功し、新規病原体診断法の重複感染症診断における有用性を証明した。(3) 既存の診断法の手順改良・評価では、尿検体を用いてもウイルス抗原(NS1 抗原)が検出されたことから、改良した方法は、病原体診断として有用であることを証明した。さらに、(4) 確立したデングウイルス感染症モデル動物(マーマセツト)では、中和抗体上昇、IgM/IgM 抗体上昇パターンおよび症状((血小板・白血球数減少、AST/ALT 上昇など)がヒトデング熱患者と類似することから、本モデル動物は、デングウイルス感染症のワクチン・治療開発に有用であることを明らかにした。

E. 結論

本研究班では、節足媒介性ウイルスであるデングウイルスの感染に対する診断および予防対策に関する研究を行った。H23-25年は、デングウイルスの新規ウイルス分離法の確立および抗原検出法の改良を行なった。本研究班で開発した新規病原体診断法(ウイルス分離)および病原体診断法(NS1 抗原)の手順改良により、既存の診断法よりも高い有用性を示したことから、デング熱の臨床診断上においては、著しく進展が見られた。さらに、デングウイルスのモデル動物開発にはウイルス学的、免疫学的などの解析を行い、本マーマセツトモデルは、病態解明および新規治療・ワクチン有効性評価と開発に有用であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

2. 学会発表

1) 国際学会

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. IV International Congress on Virology, Sapporo, Japan, 2011年8月
2. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection: revisit of antibody response and viremia in dengue patients using FcγR-expressing BHK cells. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, California, USA, 2011年6月
3. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using FcγR-expressing cells. The 61st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Atlanta, November 2012)
4. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Kotaki A, Takeshita N, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N. Dengue fever outbreak among Japanese construction workers returning from India. The 61st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Atlanta, November 2012)
5. Azami NAM, Moi ML, Takasaki T, Salleh AS, Neoh HM, Othman Z, Shah

- SA, Kurane I, Jamal R. Serological evidence of the co-circulation of multiple dengue virus serotypes in Kuala Lumpur, Malaysia. 13th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection. (China, October 2012)
6. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N, Takeshita N, Takasaki T. Ocular complications associated with imported dengue fever. 9th Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5th Regional Meeting of the International Society of Travel Medicine. (Singapore, May 2012)
 7. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Application of the dengue non-structural protein 1 (NS1) ELISA for the detection of dengue virus infection in travelers. 9th Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5th Regional Meeting of the International Society of Travel Medicine. (Singapore, May 2012)
 8. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Application of the dengue non-structural protein 1 (NS1) ELISA for the detection of dengue virus infection in travelers. Fifth Informal Japanese Encephalitis Laboratory Meeting. (Tokyo) November, 2013.
 9. Moi ML, Kurane I, Takasaki T. Development of tools for advancing dengue pathogenesis and vaccine research. Malaysia-Japan Academic Scholar Conference. (Tokyo) November, 2013
 10. Moi ML, Lim CK, Nakayama E, Tajima S, Kotaki A, Ikeda M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Imported cases of chikungunya and Ross River fever in Japan. Chikungunya, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013
 11. Lim CK, Takasaki T, Moi ML, Nakayama E, Kotaki A, Chua KB, Saijo M, Kurane I. Molecular analysis of Chikungunya virus in Malaysia. Chikungunya, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013.
- 2) 国内学会
1. Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Takasaki T, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Akari H, Kurane I. Role of antibodies in dengue infection and protective immunity during secondary infection of marmosets. The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (Osaka, November 2012)
 2. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Dengue vaccine development: re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers using FcγR-expressing cells. The 34th Naito Conference: Infection, immunity and their control for health (Hokkaido, October 2012)
 3. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. デング熱診断サーベイランスのための NS1 抗原検出診断キット. 86th Annual Meeting of the Japanese Association for Infectious Diseases (Nagasaki, April 2012)
 4. 高崎智彦、モイメンリン、網康至、須崎百合子、大松勉、平山隆則、田島茂、林昌宏、中村紳一郎、片貝裕子、吉田友教、明り宏文、白井顕治、北浦一孝、藤井克樹、鈴木隆二、西條政幸、倉根一郎. 第3回マーモセットを用いたデングウイルス感染病態解析 (九州) 2013年12月
 5. Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I, Takasaki T. Development of a novel non-human primate model for secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). 第61回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013年11月
 6. 齋藤悠香、モイメンリン、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. 日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する免疫反応の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013年11月
 7. 齋藤悠香、モイメンリン、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根

一郎、高崎智彦. 日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する中和活性および感染増強活性の検討. 第20回トガ・ペスチ・フラビウイルス研究会 (神戸) 2013年11月

8. 柄谷健太郎、清水恒広、篠原浩、土戸康弘、高崎智彦、モイメンリン. オーストラリア渡航中に発症した本邦初のロスリバーウイルス感染症1例. 第56回日本感染症学会西日本地方学会学術集会 (大阪) 2013年11月
9. Moi ML, Lim CK, Kurane I, Saijo M, Takasaki T. Towards a safe and effective dengue vaccine: assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers using a novel assay by FcγR-expressing cells. 54th Annual Meeting for the Japanese Society of Tropical Medicine. (Nagasaki) October, 2013.
10. Takasaki T, Ikeda M, Yagasaki K, Moi ML, Nakayama E, Kotaki A, Saito Y, Tajima S, Kurane I, Jee Y. JE as a vaccine preventable disease: laboratory network organized by WHO. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (熱海, 静岡) May, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書（H23-25 年度）

デングウイルス新規ワクチン開発のための病理学的評価系の確立

平成 23 年度 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部 第三室長

平成 24-25 年度 永田 典代 国立感染症研究所 感染病理部 第二室長

研究要旨：本研究では、デングウイルス様粒子を用いたワクチン開発を目標として、感染動物実験系とその病理学的評価系の確立を目的としている。初年度には、デングウイルス様粒子の発現を確認した。一方で、1～4 型全てのウイルスを VeroE6 細胞に継代しストックを調整した。次にこれらのウイルスを新生仔あるいは成マウスに接種し、その病原性を血液学的・組織学的に明らかにした。また、デングウイルス認識モノクローナル抗体を用いて、ELISA 法を利用したウイルス識別系と免疫組織化学法によるウイルス抗原検出系を確立した。

協力研究者：

国立感染症研究所 感染病理部 小島朝人、
鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、長谷川秀樹

とした(平成 23 年度)。

また一方で、ワクチン評価系のための感染動物実験系とその病理学的評価系の確立を試みた（平成 24-25 年度）。

A. 研究目的

デングウイルス(DENV)は4つの血清型を持ち、感染者の吸血蚊が媒介するヒトを宿主とするウイルスである。異なる型の DENV に再感染した場合、致死性のデング出血熱を発症する。そのため、ワクチン施策には DENV 1～4 型に対する 4 価ワクチンが必須であると考えられており、現在のところ有効なワクチンは未だ無い。

我々は日本脳炎ウイルス様粒子(JE-VLP)、ウエストナイルウイルス様粒子(WNV-VLP)を利用したワクチン開発に携わってきた。そこで本研究では、WNV prM-E 遺伝子持続発現系によるウイルス様粒子抗原の産生、および JEV prM-E 遺伝子持続発現系による VLP 抗原の産生を利用して、デングウイルスサブユニットワクチン (DEN-VLP) の開発を目標

B. 研究方法

VLP の作出

JE-VLP、WNV-VLP 産生によるワクチン開発を基礎としてデングウイルスワクチンの開発を進めた。DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し、ウエスタンブロットによって発現を確認した。

使用ウイルスと細胞

いずれも高崎智彦博士より分与いただいた。

- DENV 1 型: NIID10-07 標準株 (D1/Hu/Philippines)
- DENV 2 型: NIID20110116 株 (D2/Hu/INDIA09-74)
- DENV 3 型: Den 3, 00-27/1 株 (C6#1, Vero9013#1. 08 Decem, 2003)

- DENV 4 型: NIID 08-11 標準株 (D4/Hu/Solomon)

これらを VeroE6 細胞で継代し、培養上清で 10^5 PFU/ml 以上を回収できるように馴化した ウイルス認識モノクローナル抗体

不活化 DENV 1~4 混合抗原でプレートをコートし、JEV-E 特異的・WNV-E 特異的単クローン抗体を対照にして、入手した 4 種の DENV 認識単クローン抗体の反応性を検討した。

感染動物実験

本動物実験は国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って実施した。

新生仔マウス

生後 1 日以内の ddY マウス (SLC より購入) に対し、VeroE6 細胞で 4 継代目のウイルス感染細胞上清をそれぞれマイクロシリンジで $10 \mu\text{l}$ 、右側視床内に脳内接種した。対照群には細胞培養液 MEM $10 \mu\text{l}$ を同様に接種した。

接種後 25 日まで体重測定、臨床症状の観察を行い、病原性発現の有無を検討した。また、接種 3, 7, 25 日目に 3 または 4 匹ずつ過麻酔殺後に解剖を行い、ホルマリン灌流固定パラフィン包埋組織標本を作製した。なお、臨床症状の発現を確認し哺乳困難と判断した個体は、過麻酔殺し病理標本を作製した。

成マウス

6 週齢の ddY マウス (SLC より購入) に対し、VeroE6 細胞で 4 継代目のウイルス感染細胞上清をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ 静脈内接種した。対照群には細胞培養液 MEM $100 \mu\text{l}$ を同様に接種した。

接種後 15 日まで体重測定、臨床症状の観察を行い、病原性発現の有無を検討した。また、接種 3, 15 日目に 4 匹ずつ過麻酔下で心臓採血を行い、その後解剖し、ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を作製した。

病理学および免疫組織学的検索

10%ホルマリン緩衝液灌流および浸漬固定

後の DENV1-4 型感染マウス組織材料 (脳、脊髄、心、肺、腎、肝、脾) を用いて、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として Anti-Dengue Virus E glycoprotein antibody [8] (ab80914) を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化剤 (pH6.0) (ニチレイ) 中で 121°C 10 分オートクレーブ処理によって抗原賦活化し、過酸化水素水・メタノール (室温 30 分) による内因性ペルオキシダーゼの阻止を行った。その後は、ヒストファイブ マウスキット [マウス組織用マウス第一抗体] (ニチレイ) を用い、プロトコールに従い免疫染色を行い、ウイルス抗原を検出した。なお、1 次抗体は 2000 倍希釈し、 4°C で一晩インキュベートした。

C. 結果

1. DEN-VLP 発現ベクターの作成と発現確認: DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し、ウエスタンブロットによって発現を確認した。

2. DENV ウイルスストックの調製: ウイルス分離・ウイルス増殖に汎用されている Vero 細胞を用いてウイルスストックの調整を試みた。DENV NS1 抗原ストライプを用いた検討では、DENV 3 以外は何れもウイルス増殖陽性であった。DENV 3 は NS1 抗原陽性に転換するまで Vero 細胞での継代を繰返し、最終的に DENV 1~4 のウイルスストックを調製した(表)。

3. DENV 認識単クローン抗体 ELISA: 不活化 DENV 1~4 混合抗原、JEV、WNV 不活化粒子でプレートをコートし、JEV-E 特異的・WNV-E 特異的単クローン抗体を対照にして、入手した 4 種の DENV 認識単クローン抗

体の反応性を検討した。その結果、2H2 は DENV にのみ反応し、JEV にも WNV にも全く反応性を示さなかった。一方、4G2 は DENV, JEV, WNV 何れにも強い反応性を示した。他方、JEV, WNV などの単クローン抗体 503, N.04 は JEV のみ、WNY-11 は WNV のみ、402 は JE 血清型に属する JEV と WNV のみを認識した。

4. 新生仔 ddY マウスに DENV1 および 2 型を脳内接種したところ、感染 8-10 日目に音などの外部刺激に対して過敏反応を示し、突然走り出す、跳ねるなどの神経症状を示した。いずれもその後、哺乳困難、瀕死となったため病理解剖を行った。その結果、海馬、皮質、視床、延髄等の神経・グリア細胞にウイルス抗原陽性細胞が認められ（接種 7 日目）、これに伴う神経細胞の脱落、壊死、炎症性反応がみられた（瀕死期）。DENV3 型脳内接種マウスは感染 14 日前後から外部刺激に対する過敏反応を示し一定期間体重増加が対照群に比べて緩徐となったが、これは一過性で 25 日目には回復した。25 日目の脳組織において、巣状壊死、血管を中心とした炎症所見が見られた。病変部の変性細胞にウイルス抗原が検出された（25 日目）。DENV4 型接種マウスは 13 匹の新生仔マウスに脳内接種を行ったが、6 匹が接種翌日に死亡しており、残りの 7 匹も瀕死であった。これを病理解剖したところ、いずれの個体においても脈絡叢の血管は拡大し、血管内には血栓様の構造が見られた。ただし、この病変は脳に限局しており、肺・肝・腎などの微小血管内で同様の所見は得られなかった。

5. 成マウスはいずれの接種群も無症状で耐過した。2 型、3 型接種群は対照群を含めた他の群と比べて体重の上昇が良かった。接種 3 日目の血液検査では 2 型と 3 型接種群で血小板の有意な減少がみられ、15 日には上昇傾向が見られた。4 型接種群はいずれの接種日でも

低い傾向が見られた。また、ヘマトクリット値はウイルス接種 3 日目でいずれの接種群においても対照群に比べて低い傾向が見られたが、2 型接種群で有意な低値であった。いずれの個体も明らかな臨床症状を示さず、組織学的に著変はみられなかった。

D. 考察

DENV-VLP の作成において、ウイルス増殖性が低い DENV の 1~4 型全てでウイルスストックの調整に成功し、DENV 特異的な ELISA 系のみならず、JEV, WNV, JE 血清型群、全フラビウイルス識別 ELISA 系まで樹立できた。以上の結果は、DENV-VLP の発現、DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネルが準備できたことを示すとともに、全フラビウイルスを識別できる抗体 ELISA 系が樹立できた事も示している。また、実験に供するレベルのウイルス価が得難いとされる DENV について、1~4 型のウイルスストックの調整に成功したことは今後の感染価測定法の確立に繋がる成果であろう。DENV-VLP ワクチン作成の有力な基盤が得られたものと思われる。

一方、マウスにおける増殖性・病原性について検討したところ、今回使用した DENV4 型 NIID 08-11 標準株は、脳内接種後の新生仔マウスに非常に強い毒力を示したが、ウイルスが増殖した結果による病原性ではないと考えられるため、死因について更なる検討が必要である。組織所見から、接種後に局所に限局した急激な血液凝固反応あるいはショックを引き起こしたと考えられる。DENV1 と 2 型分離株は新生仔マウスの神経細胞、グリア細胞で増殖が可能で、ほぼ同様の病原性を発揮することが病理学的に示された。ただし、DENV2 型分離株の方が、血管を中心とした炎症性反応が強い傾向が見られた。この血管病変についても着目する必要がある。

成マウスを用いた感染実験では、接種後に血液像に変化が見られたことから、VeroE6 継代株は成マウスに対しても感染性を有すると考えられた。これまでの感染実験の結果について表に総括した。今後は、結果に基づいて、これらのウイルスと齢の異なるマウスを用いて重複感染実験を行い、病原性解析とワクチン攻撃実験に必要な動物実験系を確立する。

E. 結論

DEN-VLP の発現を確認し、ウイルス増殖性が低い DENV の 1~4 型全てのウイルスストックの調整に成功し、DENV 特異的な ELISA 系のみならず、JEV, WNV, JE 血清型群を含む、全フラビウイルスを識別できる ELISA 系まで樹立できた。

DENV1-4 型分離株を使用して、新生仔および成マウスにおける病原性を明らかにした。一方で、VeroE6 細胞、マウス組織を使用したホルマリン固定パラフィン包埋参照標本を作

製し、ウイルス抗原検出系を確立した。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

F. 健康危険情報

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 デングウイルス分与株の VeroE6 細胞における増殖性と ddY マウスに対する病原性

血清型	ウイルス株名	VeroE6 細胞		ddY マウスに対する病原性		
		継代数	上清の感染価 pfu/ml	新生仔・脳内 10 µl	新生仔・皮下 10 µl	6 週齢・静脈内 100 µl
1 型	NIID10-07 標準株 (D1/Hu/Philippines)	4	1.4 x 10 ⁶	有(致死的)	有(弱)	無
2 型	NIID20110116 株 (D2/Hu/INDIA09-74)	4	1.7 x 10 ⁶	有(致死的)	有(一過性)	有(一過性)
3 型	Den3,00-27/1(C6#1, Vero9013#1. 08Decem, 2003)	4	1.6 x 10 ⁵	有(一過性)	無	有(一過性)
4 型	NIID 08-11 標準株 (D4/Hu/Solomon)	4	8.8 x 10 ⁵	有(致死的)	有(弱)	無

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書（H23-25 年度）

海外渡航者を対象にした蚊媒介性ウイルス感染症の情報提供

研究分担者 濱田篤郎（東京医科大学病院 渡航者医療センター）
研究協力者 福島慎二、廣幡智子（東京医科大学病院 渡航者医療センター）
水野泰孝（東京医科大学病院 感染制御部）
山口佳子（東京医科大学病院 総合診療部）
倉林英彦、村田英美（一般財団法人 海外邦人医療基金）
菊池宏久（マニラ日本人会診療所）

研究要旨

海外渡航者にとって蚊媒介性ウイルス感染症は重要な健康問題であり、とくにデング熱は東南アジアに滞在する日本人の間で患者が多数発生していた。この状況を改善するため、流行地域に滞在する渡航者には適切な予防対策を提供することが必要であるが、在留邦人、企業の健康管理担当者、一般の海外渡航者において知識状況や必要とする情報に違いがみられた。こうした各集団の特性を考慮して、我々はホームページ、出版物、ポスター、動画（DVD）、講演会などの媒体を用いて、海外渡航者にデング熱を予防するための情報提供を行った。

A. 研究目的

海外渡航者にとって蚊媒介性ウイルス感染症は重要な健康問題の一つである。とりわけデング熱は患者数が多く、国内で診断される患者数が毎年 200 人以上にのぼっている。さらに、日本脳炎、黄熱、チクングニア熱なども海外渡航者にリスクのある蚊媒介性ウイルス感染症にあげられる。こうした感染症については国民に情報が広く浸透しておらず、海外渡航時に効果的な予防対策がとられていないのが現状である。そこで本研究では海外渡航者に必要とされる蚊媒介性ウイルス感染症の情報内容を調査し、その提供を行うことを

目的とする。

B. 研究方法

1. 海外在留邦人のデング熱罹患状況の調査

日本国内で診断されるデング熱患者数は厚生労働省より毎年報告されているが、海外で診断される日本人患者についてはその実態が明らかになっていない。そこでフィリピンのマニラ日本人会診療所を受診する在留邦人を対象に、デング熱罹患状況について調査を行った。また、患者の多発する地域で環境調査を行い、感染のおこる背景について検討した。

2. 海外渡航者に必要な情報内容の調査

海外渡航者がデング熱などの感染症対策を

行う際に必要な情報を明らかにするため、「海外在留邦人」、「企業の健康管理担当者」、「一般の海外渡航者」、を対象に、「海外渡航者の感染症対策状況に関する調査」と「デング熱の知識状況に関する調査」を行った。調査方法としては、講演会場でのアンケート配布、調査対象へのアンケート郵送、インターネットによるアンケート調査を対象に応じて選択した。

3. 海外渡航者への情報提供

以上の調査結果をもとにデング熱など蚊媒介性ウイルス感染症に関する情報提供を各種媒体で行った。

(倫理面への配慮)

原則的には、ヘルシンキ宣言における臨床研究の基準を遵守した。アンケート調査や問診紙の調査においては匿名とし、番号のみで登録した。

C. 研究結果

1. 海外在留邦人のデング熱罹患状況調査

2012年～2013年に、フィリピンのマニラ日本人会診療所でデング熱と診断された在留邦人の患者を対象に調査を行った。デング熱の診断は抗原検出キット(NS1抗原)か抗体検出キット(IgM抗体、IgA抗体)で陽性になった者とした。その結果、2012年は55名、2013年は54名のデング熱患者が確認された。このうち30%前後の患者が入院しているが、全例が重症化することなく回復した。患者の発生は雨期となる6月～8月に多くみられた。患者の滞在形態は、2012年は帯同家族が半数以上と多かったが、2013年は帯同家族が少なくなり、駐在員本人が半数以上を占めた。

患者の感染場所を明らかにするため、2013年7月以降は患者の居住地域を特定するよう

にした。その結果、居住地域が判明したデング熱患者42名のうち、R地区の居住者が12名(28.6%)と多かった。R地区はマニラ市内にある新興住宅街で、日本人の居住者も増加傾向にある。2013年12月に環境調査を行ったところ、同地区には建設工事現場が多く、蚊の繁殖しやすい水たまりが多数みられた。また、同地区には緑地が多く、そこで在留邦人が蚊に刺される機会が多いものと推測された。さらに、R地区に隣接してスラム街があり、この住民の間で患者が多発している可能性があった。このようにR地区は、デング熱感染に必要な要因が備わる環境にあった。

2. 海外渡航者に必要な情報内容の調査

(1) 海外渡航者の感染症対策調査

各調査対象におけるデング熱を中心にした感染症対策の現状について調査を行った。

「海外在留邦人」の調査は2011年12月、インドネシア・ジャカルタ、フィリピン・マニラに在住する日本人を対象に実施した。アンケートの配布は現地で開催された医療講演会の参加者やその関係者を中心に行い、ジャカルタから100名、マニラから76名の回答があった。「心配している感染症は何か?」の質問では「デング熱」の回答が最も多く、「周囲でデング熱患者が発生したか?」の質問にはジャカルタで48%、マニラで68.4%が「発生した」と回答した。「予防対策を実施しているか?」については、マニラでは「実施している」が67.1%だったが、ジャカルタでは34%と少なかった。予防対策を実施していない者に理由を質問したところ、「予防方法が不明」との回答が大多数を占めた。

「海外派遣企業の健康管理担当者」の調査は2013年11月～12月、海外邦人医療基金の会員企業(161社)の健康管理担当者を対象

に、アンケート郵送方式で実施した。この結果、68社(42.2%)から回答を得ることができた。海外勤務者の健康問題として「感染症の重要性」を聴取したところ、「大変重要」と答えた企業が60社(88.2%)にのぼった。また、心配な感染症としてはウイルス性肝炎、狂犬病に続いてデング熱(51社)が上位に挙げられた。また、デング熱に罹患した従業員がいると回答した企業が20社(29.4%)と比較的多かった。罹患経験のある従業員の再感染による重症化の予防対策を聴取したところ、「蚊に刺されない対策の指導」や「再感染時の迅速な医療機関への受診指導」が多く、「流行地域に滞在させない指導」を行っている企業も少数みられた。

「一般の海外渡航者」については、2012年4月、ロングステイ財団の旅行モニター(海外旅行に興味のある成人)を対象にインターネットによる調査を実施した。この結果、1648名から回答を得ることができた。「旅先の健康問題として感染症に関心がある」と回答した者は816名だったが、関心のある感染症は下痢症、マラリア、ウイルス肝炎が多く、デング熱は275名(33.7%)と少なかった。デング熱の知識状況を聴取したところ、「全く知らない」と「あまり知らない」の合計が1219名(73.9%)で大多数を占めた。

(2) デング熱の知識状況に関する調査

各調査対象にデング熱の原因、疫学、症状、予防、治療に関する10の質問を記載した用紙を配布し、その答えを「はい」か「いいえ」で答える形式をとった。

「海外在留邦人」の調査は2011年12月、インドネシア・ジャカルタ、フィリピン・マニラで在住する日本人を対象に実施した。調査方法は前述した両都市での医療講演会の場

で質問用紙を配布した(ジャカルタ:100名、マニラ:76名)。この結果、「蚊に刺されて感染する(正解:はい)」の正解率は100%近くに達したが、具体的な予防対策の質問である「昼間、蚊に刺されないよう注意すれば予防できる(正解:はい)」の正解率は50%台と低い結果になった。なお、マニラでは2013年12月に再調査を行っているが、2011年と同様な結果だった。

「海外派遣企業の健康管理担当者」の調査は2013年2月、都内で開催した医療講演会の参加者(104名)を対象に実施した。この結果、「昼間、蚊に刺されないよう注意すれば予防できる(正解:はい)」、「命にかかわる病気である(正解:はい)」の正解率が60%台と低かった。

「一般の海外渡航者」の調査は、我々がインターネット上に開設した「デング熱e-learning」(HP「海外旅行と病気」に掲載)の回答者を対象に行った。その結果、2011年12月~2013年11月までに830名の回答が得られた。正解率については、「日本国内でも流行している(正解:いいえ)」、「ワクチンで予防できる(正解:いいえ)」といった基本的な質問が70%台と低かった。

3. 海外渡航者への情報提供

以上の調査結果をもとに各種媒体を用いて海外渡航者への情報提供を行った。

(1) ホームページの設置

インターネット上にホームページ「海外旅行と病気」(<http://www.trad-dis.org>)を開設し、デング熱など海外渡航に関連する病気の情報提供を行った。2013年のアクセス件数は毎月3000件前後に増加し、とくに8月~9月の夏休みシーズンには月5000件に達した。

(2) デング熱に関するパンフレットの作成

海外渡航者向けにパンフレット「デング熱豆知識」を2011年度に作成し、トラベルクリニックや東南アジアの日本人会などに配布した。

(3) デング熱に関するポスターの作成

デング熱を媒介する蚊の吸血時間帯に関する情報が不足していたため、この点を海外渡航者に啓発するポスター「昼の吸血鬼にご用心」を2012年度に作成した。このポスターは検疫所、国内のトラベルクリニック、海外派遣企業の健康管理室などに配布した。

(4) デング熱予防対策の動画 (DVD) 作成

海外渡航者にデング熱の予防法を具体的に理解してもらうため、動画 (DVD) を2013年度に作成した。この動画はホームページ「海外旅行と病気」などで一般向けに公開している。

(5) デング熱予防マニュアルの作成

トラベルクリニックや海外派遣企業の医療関係者を対象に、デング熱の予防を指導するためのマニュアルを2013年度に作成した。このマニュアルはトラベルクリニックや企業の健康管理室に配布する予定である。

(6) 医療講演会の開催

定期的にデング熱を中心にした感染症に関する医療講演会を開催した。

2011年12月：ジャカルタ（在留邦人対象）

マニラ（在留邦人対象）

2013年2月：東京（企業の健康管理担当者）

2013年12月：マニラ（在留邦人対象）

D. 考察

マニラ在留邦人の間でデング熱の患者は2012年、2013年ともに6月～8月の雨期に多発していた。患者の一部は入院を要したが、重症化する例はなく、全員軽快していた。患

者の居住地域をみるとマニラ市内のR地区が多く、環境調査を行ったところ、建設工事による水たまりが数多くみられ、媒介蚊が生息しうる環境になっていた。さらに同地区はスラム街に隣接しており、周囲にデング熱患者が多い環境にあった。こうした現地環境を熟知したうえで、情報提供を行う必要がある。

「海外渡航者の感染症対策調査」は海外在留邦人、海外派遣企業の健康管理担当者、一般の海外渡航者を対象に実施した。「海外在留邦人」の調査はジャカルタとマニラで行ったが、感染症の中でもデング熱への関心が高い結果だった。その一方で、デング熱の予防対策を実施している者は一部の在留邦人で、予防対策を実施しない理由としては「予防方法が不明」が多くを占めていた。「企業の健康管理担当者」を対象にした調査でもデング熱への関心は高く、デング熱に罹患した従業員がいると回答した企業も比較的多かった。罹患経験のある従業員の再感染による重症化予防策は概ね適切であったが、「流行地域に滞在させない指導」を行っている企業が少数みられた。「一般の海外渡航者」の調査では、デング熱への関心が低く、その知識についても「全く知らない」と「あまり知らない」が大多数を占めていた。このように、各調査対象によって必要とする情報が異なることが明らかになった。

「デング熱の知識状況」に関する調査では、「流行地域の在留邦人」や「企業の健康管理担当者」については、基本的なデング熱の知識があるものの、蚊の対策（とくに吸血時間が昼間であること）についての知識が不足していることが明らかになった。その一方で、「一般の海外渡航者」についてはデング熱の基本的な知識が不足していることが明らかに

なった。このように、各調査対象で知識レベルにも差があり、その特性に応じた情報提供が必要であると考える。

なし

以上の調査結果にもとづいて、それぞれの対象に応じた情報提供を、ホームページ、出版物、ポスター、動画（DVD）、講演会などの媒体を用いて行った。

3. その他

なし

E. 結論

海外渡航者にとって蚊媒介性ウイルス感染症は重要な健康問題であり、とくにデング熱は東南アジアなどで罹患する日本人が数多くみられた。このため、流行地域に滞在する渡航者には適切な予防対策を提供することが必要であるが、在留邦人、企業の健康管理担当者、一般の海外渡航者において知識状況や必要とする情報に違いがあることが明らかになった。こうした各集団の特性を考慮して、我々はホームページ、出版物、ポスター、動画（DVD）、講演会などの媒体を用いて、海外渡航者にデング熱を予防するための情報提供を行った。これらの成果物により海外渡航者のデング熱罹患が減少していくことを期待している。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策
の確立に関する研究」(H23-新興-一般-010)

分担研究報告書 (H23-25)

チクングニアウイルスのコモンマーモセットモデルにおける病理学的解析お
よび夏期の日本旅行後デング熱を発症したドイツ人デング熱患者症例と実験
室確認診断

研究分担者 倉根一郎 (国立感染症研究所副所長)
研究協力者 林 昌宏 (国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長)
高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長)
鈴木隆二 (国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室長)
網 康至 (国立感染症研究所動物管理室主任研究官)
藤井克樹 (国立感染症研究所ウイルス第二部研究員)
モイ メンリン (国立感染症研究所ウイルス第一部研究員)
北浦一 孝 (国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室流動研究員)
白井顕治 (筑波大学大学院人間総合科学研究科ウイルス医学)
松井珠乃 (国立感染症研究所感染症疫学センター)
森川 茂 (国立感染症研究所獣医科学部長)
西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第一部長)

研究要旨

チクングニア熱が近年アフリカ東岸から南アジア, 東南アジアにかけて大流行している. また温帯地域における初めての国内流行がイタリア (2007 年), フランス (2010 年) に 7 報告された. したがって媒介蚊の生息する日本国内へのチクングニアウイルス (CHIKV) の侵淫の可能性は否定できない. これまでに我々はコモンマーモセットを用いた CHIKV 感染モデルの検討を行った. その結果, CHIKV の接種により高いウイルス血症と迅速な特異的抗体の上昇を観察した. そこで本研究において CHIKV 接種マーモセットに対する病理学的解析を行った. その結果 CHIKV 接種 4~21 日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出された. また肝臓および脾臓において特異的抗原が検出され, 肝臓においては肝のシングルセルネクロシス, 細胞浸潤, 脾臓においては二次濾胞の形成および starry sky 像が観察された.

日本 (本州) 旅行から帰国したドイツ人が, 2013 年 9 月 9 日にドイツ (ベルリン) の病院を受診. 9 月 3 日より, 40 度の熱, 嘔気, 続いて, 斑状丘疹状皮疹が出現. 入院 9 日前に, 2 週間の日本旅行 (8 月 19~31 日) から直行便にて帰国した. 鑑別診断の結果, 臨床像よりデング熱を疑った. 発症後 7 日目の血清で, デングウイルス IgM 及び IgG 抗体価試験, デングウイルス NS1 抗原及び迅速試験で全て陽性であったことから, 患者はデングウイルス急性感染であることが示された. デングウイルス RNA 遺伝子は陰性であった. 日本からのデング熱の輸入症例は極めて珍しいことから, 2013 年 12 月 (発症後 110 日目) に第 2 回目の血清を採取して検査した. 検体をドイツから国立感染症研究所に送付していただき, 確認検査を実施した. その結果, デングウイルス非構造蛋白抗原陽性, 抗デングウイルス IgM 抗体陽性, IgG 抗体陽性であった. また, 中和抗体を測定した結果, デングウイルス 2 型に対して 1, 3, 4 型および日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価より有意

に高く、デングウイルス 2 型感染であったと診断された。

A. 研究目的

近年チクングニアウイルス (Chikungunya virus: CHIKV) がアフリカ東岸からインド, 東南アジアにかけて再興している. 我が国においても毎年 10 数例の輸入症例が報告されている. CHIKV はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖の (+)RNA ウイルスであり, チクングニア熱の原因ウイルスである. CHIKV は蚊媒介性ウイルスであり, その媒介蚊はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) や日本にも広範囲に生息するヒトスジシマカ (*A. albopictus*) などのヤブカ属のカである. 2005 年のレユニオン島でのチクングニア熱の流行においては, 呼吸器不全, 心代償不全, 髄膜脳炎, 劇症肝炎, 腎不全等の症状と 219 人の死者が報告された. したがってチクングニア熱の病態はいまだ不明である. 近年コモンマーモセット (マーモセット) が新たな霊長類モデルとして注目されている. そこで我々はマーモセットを用いた CHIKV 感染モデルの検討を行った. その結果, CHIKV の接種により高いウイルス血症と迅速な特異的抗体の上昇を観察した. そこで本研究の目的は CHIKV 接種マーモセットに対する病理学的解析を行うことである.

また, デング熱もチクングニア熱ともにウイルス血症が高く輸入症例から国内発生の可能性がある. ドイツ Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine およびロベルトコッホ研究所からの情報提供を受け, 日本からの輸出デング熱疑い症例の確認検査を実施した.

B. 研究方法

マーモセットモデル

ウイルスと培養細胞: 感染実験には CHIKV SL10571 株を供試した. ウイルス分離およびウイルス中和試験にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection).

動物: 体重 300 g ~ 379 g のコモンマーモセ

ット (*Callithrix jacchus*) を用いた. ウイルス学的解析は採取した組織よりウイルス遺伝子を抽出し, TaqMan リアルタイム RT-PCR 法により組織中のウイルス遺伝子量を検出した. 採取した組織は病理学的解析を実施した.

輸出デング熱症例の検討 (検査方法)

1) デングウイルス NS1 抗原検出

Platelia Dengue NS1 Ag ELISA キット (BioRad 社) を用いた.

2) 抗デングウイルス IgM 抗体

抗デングウイルス IgM 抗体捕捉 ELISA キット (Focus Diagnostics 社) を用いた.

3) 抗日本脳炎 IgM 抗体

抗日本脳炎ウイルス IgM 抗体捕捉 ELISA 法 (in house) により, $P/N \text{ 比} = (\text{検体の OD 値}) / (\text{陰性コントロールの OD 値})$ を算出し, P/N 比 2.0 以上を陽性と判定した.

4) 抗デングウイルス, 日本脳炎ウイルス中和抗体測定

BHK 細胞, Fc γ R 発現 BHK 細胞, Vero 細胞を用いた 50% プラーク減少法により測定し, 10 倍希釈よりの 2 倍階段希釈法により Endpoint を決定し抗体価を決定した.

C. 研究結果

● マーモセットモデル

組織中の CHIKV RNA 量の検討: 脾臓, 腋窩リンパ節においてウイルス RNA が検出された. 脊髄, 大腿筋, 心筋, 大脳, 小脳, 肺からはウイルス RNA は検出されなかった. また対照個体である #5017 からはウイルス RNA は検出されなかった.

病理学的解析: マーモセットの肝臓において, 細胞浸潤, 肝のシングルセルネクローシスが認められ, 類洞内への細胞浸潤, 肝細胞, 肝管上皮細胞および kupper 細胞に特異的抗原が観察された. 肝細胞, kupper 細胞に特異的抗原が観察された. また脾臓においては二次濾胞の形成, 二次濾胞において starry sky 像

が観察された。

● 輸出デング熱症例の検討

日本からのデング熱の輸入症例は極めて珍しいことから、ドイツ Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine では、2013年12月（発症後110日目）に第2回目の血清サンプルを採取し、デングウイルス IgM 及び IgG 抗体が有意に減少、デングウイルス NS1 抗原（ELISA 法、迅速試験）が陰性との結果が得られたことから、患者はデングウイルスに感染したと判断された。IgG 抗体が、20480 倍から 640 倍に有意に低下したという点が、通常デング熱感染では起こらない現象であるため、ワクチン接種歴を確認したところこの患者は 2009 年に、ケニヤに旅行する際に黄熱ワクチンを接種していたことが判明した。

デングウイルスおよび日本脳炎ウイルス IgM 捕捉 ELISA 法によりそれぞれの IgM 抗体を測定したところ、デングウイルスに対しても日本脳炎ウイルスに対しても陽性であったが、デングウイルスに対して高かった。また中和抗体価の測定結果では、デングウイルス 2 型に対して 640 倍、1 型および 3 型に対して 10 倍、4 型に対して 10 倍以下、日本脳炎ウイルスに対して 40 倍であった。また、FcγR 発現 BHK 細胞を用いた場合でもデングウイルス 2 型に対して有意な低下を認めず 320 倍であった。

D. 考察

CHIKV 接種 3, 7, 10, 21 日後に安楽殺を行いコモンマーモセットの各臓器を採取しウイルス学および病理学的解析を行った。接種後 4~21 日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出されたことから CHIKV の感染が成立した可能性が示唆された。また肝臓、脾臓に特異的抗原が検出され、肝細胞に特異的抗原の観察、肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤が観察され、さらに脾臓においては二次濾胞の形成および二次濾胞内に starry sky 像が観察さ

れたことから CHIKV の感染が成立した可能性が示唆された。

ドイツ Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine では、抗体測定に蛍光抗体法（IF）を用いている。この方法で IgG 抗体を測定すると感度が良いためかなりの交差反応を拾うことになる。急性期血清中の IgG 抗体価が 20,480 と非常に高値であったのは、2009 年に接種した黄熱ワクチンによる IgG 抗体が交差反応し抗体価を押し上げたものと考えられる。2013 年は FIFA ワールドカップがデング熱および黄熱の流行地であるブラジルで開催されることから黄熱ワクチン接種後のブラジルからのデング熱輸入症例の発生が危惧されているところである。血清診断において本症例と同様の現象がみられる可能性が高く十分な注意が必要である。

E. 結論

急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチクングニア熱およびデング熱は今後も流行が続くことが予想される。したがって日本においてもサーベイランス体制の充実、媒介蚊対策、将来のワクチン開発、特異的治療法の開発は重要な課題である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S Kutsuna, Y Kato, T Takasaki, M L Moi, A Kotaki, H Uemura, T Matono, Y Fujiya, M Mawatari, N Takeshita, K Hayakawa, S Kanagawa, N	Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014.	Eurosurveillance	19(4)	8-11	2014
Lucky Ronald Runtuwene, Eiji Konishi, Atsushi Yamanaka, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita	Novel method for mass-infecting Aedes aegypti with dengue virus type 2	Parasites & Vectors	in press		2014
Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I.	Determination of antibody concentration as the main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells.	Arch Virol.	159(1)	103-116	2014
Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Suzuki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I.	Demonstration of marmosets (Callithrix jacchus) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viremia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans.	J Gen Virol.	95	591-600	2014
Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T	Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon.	J Gen Virol.	95	60-65	2014
Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I.	Determination of antibody concentration as the main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells.	Arch Virol.	159(1)	103-115	2014
Moi ML, Omatsu T, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I.	Presence of viral genome in urine and development of hematuria in common marmosets (Callithrix jacchus) after inoculation with dengue virus.	Pathogens	2	357-363	2013
Meng Ling Moi, Tsutomu Omatsu, Shigeru Tajima, Chang-Kweng Lim, Akira Kotaki, Makiko Ikeda, Fumiue Harada, Mikako Ito, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki.	Detection of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) by Using ELISA as a Useful Laboratory Diagnostic Method for Dengue Virus Infection of International Travelers	J Travel Med.	20(3)	185-193	2013
Tomoyuki Yoshida, Tsutomu Omatsu, Akatsuki Saito, Yuko Katakai, Yuki Iwasaki, Terue Kurosawa, Masataka Hamano, Atsunori Higashino, Shinichiro Nakamura, Tomohiko Takasaki, Yasuhiro Yasutomi, Ichiro Kurane, Hirofumi Akari	Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection	Arch Virol.	158(6)	1209-1220	2013
Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R.	Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes.	PLoS One	8(2)	e56296	2013
Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I.	Dengue virus infection-enhancing activity of undiluted sera obtained from patients with secondary dengue virus infection.	Trans R Soc Trop Med Hyg.	107(1)	51-58	2013

Yamaguchi Y, Nukui Y, Kotaki A, Sawabe K, Saijo M, Watanabe H, Kurane I, Takasaki T, Tajima S.	Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein.	J Gen Virol	90-96	90-96	2013
Yuki Takamatsu, Leo Uchida, Phan Thi Nga, Kenta Okamoto, Takeshi Nabeshima, Dang Thi Thu Thao, Do Thien Hai, Nguyen Thi Tuyet, Hoang Minh Duc, Le Xuan Luat, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita	An approach for differentiating Echovirus 30 and Japanese encephalitis virus infections in acute meningitis/encephalitis: a retrospective study of 103 cases in Vietnam	Virology Journal	10	280	2013
Hayasaka D, Aoki K, Morita K	Development of simple and rapid assay to detect viral RNA of tick-borne encephalitis virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification	Virology Journal	4	10-68	2013
Basu D. Pandey, Takeshi Nabeshima, Kishor Pandey, Saroj P. Rajendra, Yogendra Shah, Bal R. Adhikari, Govinda Gupta, Ishan Gautam, Mya M. N. Tun, Reo Uchida, Ichiro Kurane and Kouichi Morita	First Isolation of Dengue Virus from the 2010 Epidemic in Nepal	Tropical Medicine and Health	41(3)	1-9	2013
Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Soengeng Soegijanto and Eiji Konishi	Dengue virus infection-enhancing and neutralizing antibody balance in children of the Philippines and Indonesia	Microbes Infect	14(13)	1152-1159	2012
Kris Cahyo Mulyatno, Atsushi Yamanaka, Subagyo Yotopranoto, Eiji Konishi	Vertical transmission of dengue virus in <i>Aedes aegypti</i> collected in Surabaya, Indonesia, during 2008–2011	Jpn J Infect Dis	65 (3)	274-276	2012
Yamaji H, Segawa M, Nakamura M, Katsuda T, Kuwahara M, Konishi E.	Production of Japanese encephalitis virus-like particles using the baculovirus-insect cell system	J Biosci Bioeng	114(6)	657-62	2012
Eiji Konishi , Yoko Kitai, Koichi Nishimura, and Seiya Harada	Follow-up survey of Japanese encephalitis virus infection among humans in Kumamoto Prefecture, south-west Japan: status during 2009–2011	Jpn J Infect Dis	65(5)	448-50	2012
Yamaji H, Nakamura M, Kuwahara M, Takahashi Y, Katsuda T, Konishi E	Efficient production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant lepidopteran insect cells	Appl Microbiol Biotechnol	Epub ahead of print	5-Sep	2012
Sjatha F, Takizawa Y, Yamanaka A, Konishi E	Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 3 isolated in Jakarta, Indonesia in 1988	Infect Genet Evol	12(8)	1938-43	2012
Miwa Kuwahara, Yoko Kitai, Takashi Kondo, Eiji Konishi	Survey of antibodies specific for West Nile virus in horses from 2006 to 2010 in Japan	Jpn J Infect Dis	65(6)	553-5	2012
Kenta Okamoto, Hitomi Kinoshita, Maria del Carmen Parquet, Muhareva Raekiansyah, Daisuke Kimura, Katsuyuki Yui, Mohammed Alimul Islam, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita	Dengue virus strain DEN2 16681 utilizes a specific glycochain of syndecan-2 proteoglycan as a receptor.	Journal of General Virology	93(4)	761-770.	2012
Takahisa Furuta, Lyre Anni Murao, Nguyen Thi Phuong Lan, Nguyen Tien Huy, Vu Thi Que Huong, Tran Thi Thuy, Vo Dinh Tham, Cao Thi Phi Nga, Tran Thi Ngoc Ha, Yasukazu Ohmoto, Mihoko Kikuchi, Kouichi Morita, Michio Yasunami, Kenji Hirayama, and Naohiro Watanabe	Association of Mast Cell-Derived VEGF and Proteases in Dengue Shock Syndrome	PLoSNTD	6	e1505	2012

Lauber C, Ziebuhr J, Junglen S, Drosten C, Zirke F, Nga PT, Morita K, Snijder EJ, Gorbalenya AE.	Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses.	Arch Virol.	157	1623-1628.	2012
Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R.	A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay	J Immunol Methods.	384	81-91	2012
Ujiie M, Moi ML, Kobayashi T, Takeshita N, Kato Y, Takasaki T, Kanagawa S.	Dengue Virus Type-3 Infection in a Traveler Returning From Benin to Japan	J Travel Med.	19	255-257	2012
Tsutomu Omatsu, Meng Ling Moi, Tomohiko Takasaki, Shinichiro Nakamura, Yuko Katakai, Shigeru Tajima, Mikako Ito, Tomoyuki Yoshida, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari & Ichiro Kurane	Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (<i>Callithrix jacchus</i>) after inoculation with dengue virus	J Med Primatol	2012	1-8	2012
Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K, Kurane I, Takasaki T.	Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum.	J Clin Microbiol.	50	2047-2052	2012
廣幡智子、山田美鈴、濱田篤郎	海外渡航にともなう健康問題に関する意識調査	日本渡航医学会誌	6	20-24	2012
Tomohiko Takasaki	Imported dengue fever/dengue hemorrhagic fever cases in Japan	Tropical Medicine and Health	39(4)	13-15	2011
<u>Eiji Konishi</u> and Yamato Takizawa	Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice	J Vaccin Vaccinat	1	1000102	2011
<u>Eiji Konishi</u> , Yuko Miyagawa	Balance of infection-enhancing and neutralizing antibodies induced by a dengue tetravalent DNA vaccine in a mouse model.	Microbes and Infection	13	1091-8	2011
<u>Eiji Konishi</u> and Mayu Konishi	Nonstructural protein 1 antibody-based epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate Japanese encephalitis virus from dengue virus infections in humans.	Japanese Journal of Infectious Diseases	64	284-91	2011
石川 知弘、小西 英二	フラビウイルス	ウイルス	61	221-238	2011
Kris Cahyo Mulyatno, Atsushi Yamanaka, Ngadino and <u>Eiji Konishi</u>	Resistance of <i>Aedes aegypti</i> larvae to temephos insecticide in Surabaya, Indonesia	Southeast Asian J Trop Med Public Health	43	29-33	2012
Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Atsushi Yamanaka, Soegeng Soegijanto, <u>Eiji Konishi</u>	First isolation and phylogeny of Chikungunya virus from Surabaya, Indonesia	Jpn J Infect Dis	65	92-94	2012
<u>小西英二</u>	Dengue ワクチン	日本臨床	69	1617-1621	2011
<u>小西英二</u>	Dengue 熱とワクチン開発	Pharma Medica	29	49-52	2011
M.L. Moi, C.K. Lim, K.B. Chua, T. Takasaki, I. Kurane.	Dengue virus infection- enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using FcγR-expressing cells.	PLoS Neglected Tropical Diseases	6	e1536	2012
Ujiie M, Moi ML, Takeda N.	Dengue maculopathy in a traveler.	Am J Trop Med Hvg.	85	965-966	2011

Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I.	Common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity.	J Gen Virol	92	2272-2080	2011
--	---	-------------	----	-----------	------

研究成果の刊行に関する一覧表(ガイドラインその他)

	タイトル	発行所	出版社名	発行年
濱田篤郎 監修	デング熱予防マニュアル	東京医科大学病院 渡航者医療センター	(株)アイワエンター プライス	2013
濱田篤郎 監修	デング熱豆知識	東京医科大学病院渡航者医療センター		2013
濱田篤郎 監修	昼の吸血鬼に御用心 (ポスター)	東京医科大学病院渡航者医療センター		2012
濱田篤郎、沢辺京子、駒形修、小川修平、高崎智彦	デング熱の予防対策 (動画)	東京医科大学病院渡航者医療センター 国立感染症研究所		2014
高崎智彦、松井珠乃、モイメンリン	デング熱対策ガイドライン	国立感染症研究所 ウイルス第一部 感染症疫学センター		2014